

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 6 月 10 日 (10.06.2004)

PCT

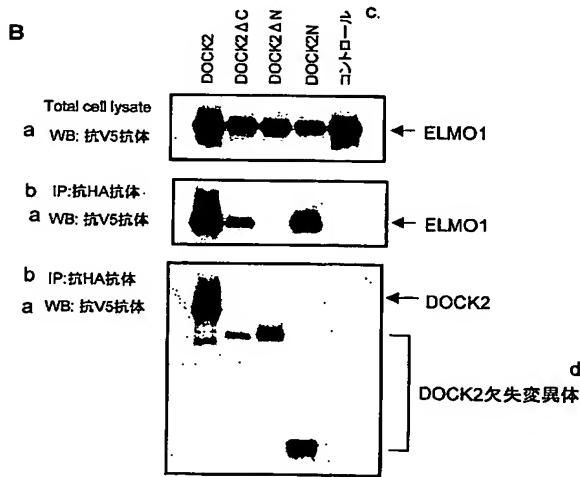
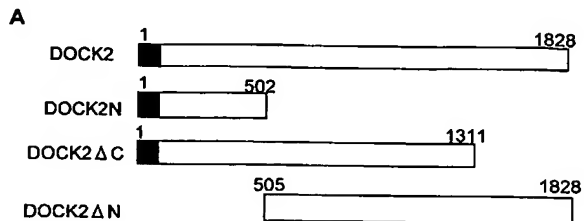
(10) 国際公開番号  
WO 2004/048974 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: G01N 33/566, TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).  
33/50, 33/15, C12N 15/12
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014538
- (22) 国際出願日: 2003 年 11 月 14 日 (14.11.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2002-342683  
2002 年 11 月 26 日 (26.11.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 福井 宣規 (FUKUI, Yoshinori) [JP/JP]; 〒814-0011 福岡県福岡市早良区高取 2-1 5-1 6 Fukuoka (JP). 笹月 健彦 (SASAZUKI, Takehiko) [JP/JP]; 〒151-0066 東京都渋谷区西原 1-4 8-1-1 0 8 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052 東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CA, US.

/続葉有/

(54) Title: FUNCTIONAL DOMAIN AND ASSOCIATED MOLECULE OF DOCK2 ESSENTIALLY REQUIRED IN LYMPHOCYTE MIGRATION

(54) 発明の名称: リンパ球遊走に不可欠な DOCK2 の機能ドメイン及び会合分子



a...WB:ANTI-V5 ANTIBODY  
b...IP:ANTI-HA ANTIBODY  
c...CONTROL  
d...MUTANT LACKING DOCK2

(57) Abstract: It is intended to provide a method of screening a substance interfering the association of DOCK2 with ELMO1, a method of screening a substance interfering the association of ELMO1 with Tiam1, a method of searching for remedies for immune-related diseases such as allergy, autoimmune diseases, GvH and graft rejection by using these screening methods, etc. It is found out that a DOCK2 mutant lacking 504 amino acid residues at the N-end of DOCK2 shows a remarkably lowered ability to activate Rac and cannot induce actin polymerization. ELMO1 is identified as a molecule binding to this region. It is also found out that DOCK2 is associated with ELMO1 via the SH3 domain. It is furthermore found out that ELMO1 binds to Tiam1 which acts as a Rac-specific GDP/GTP exchange factor (GEF). Thus, it is found out that DOCK 2 recruits Tiam1 via ELMO1 and thus activates Rac.

(57) 要約: DOCK2 と ELMO1 との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、ELMO1 と T i a m 1 との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、これらスクリーニング方法を利用するアレルギー、自己免疫疾患、G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法等を提供するものである。DOCK2 の N 末端の 504 アミノ酸残基を欠失した DOCK2 変異体では R a c 活性化能が著しく低下し、アクチン重合を惹起できないことを見出し、この領域に結合する分子として ELMO1 を同定した。DOCK2 は SH3 ドメインを介して ELMO1 に会合していることを見出した。さらに、ELMO1 が、R a c 特異的な GDP/GTP 交換因子 (GEF) として機能する T i a m 1 と結合することを見出した。DOCK2 は ELMO1 を介して T i a m 1 をリクルートすることにより R a c を活

性化していることを見出した。



(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明細書

リンパ球遊走に不可欠なD O C K 2の機能ドメイン及び会合分子

## 5 技術分野

- 本発明は、欠失変異体を用いたD O C K 2機能ドメインの同定や、D O C K 2及びD O C K 2のS H 3ドメインとの結合を干渉する物質のスクリーニング、とりわけD O C K 2とE L M Oとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、E L M OとT i a m等のG D P / G T P交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、これらスクリーニング方法を利用するアレルギー、自己免疫疾患、G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法等に関する。

## 背景技術

- 15 免疫応答は、生体にとって感染に対する必須の防御機構であり、免疫細胞は、種々の感染源に迅速に対処すべく生体内を常にパトロールしている。このように構成細胞が絶えず動き回るという特徴は、他の生命複雑系においては認められず、免疫系独自に進化したものである。免疫細胞のうち、好中球、マクロファージといった細胞は感染の初期防御において機能する一方、Tリンパ球及びBリンパ球はその抗原受容体を介して外来異物を認識することで抗原特異的な免疫応答を引き起こすことが知られている。上記T及びBリンパ球は、胸腺、骨髄といった1次リンパ組織で分化し、脾臓、リンパ節、パイエル板（小腸のリンパ組織）といった2次リンパ組織の特定のコンパートメントへ移動した後、ここで、  
25 種々の組織から集められた抗原を、かかる抗原受容体を介して認識することにより特異的な免疫応答を惹起する。この際、リンパ球が2次リン

パ組織の特定の部位に移動することは、免疫応答の成立において極めて重要である。これまで、リンパ球の移動が、種々のケモカインと総称されるタンパク質によって導かれることは知られているが、リンパ球の運動性そのものを制御する分子機構に関しては不明であった。

- 5 細胞運動には、細胞極性の変化と細胞骨格の再構築が必須であり (Cell 84, 359-369, 1996)、これらはいずれも R h o、R a c、C d c 4 2 と  
10 いった低分子量 G タンパク質によって制御されていることが知られている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5027-5031, 1995 ; Science 279, 509-514 1998 ; J. Cell Biol. 141, 1147-1157, 1998 ; Science 287,  
1037-1040, 2000)。この中でもとりわけ R a c は、葉状突起と呼ばれる  
15 アクチンに富んだ突起を形成することで細胞運動の際の駆動力を提供している (Science 279, 509-514 1998 ; Cell 103, 227-238, 2000)。他方、線虫 (Caenorhabditis elegans)、ヒト及びショウジョウバエ (Drosophila melanogaster) において、C E D 5、D O C K 1 8 0、Myoblast city  
20 (M B C) という構造上相同性を示す分子が同定され、これらの分子はその頭文字をとって C D M ファミリー分子と呼ばれており、いずれも R a c の上流で機能することで細胞骨格の再構築に関与すると考えられている (Cell 84, 359-369, 1996 ; J. Cell Biol. 138, 589-603, 1997 ; Nature 392, 501-504, 1998 ; Genes Dev. 12, 3331-3336, 1998 ; Genes Dev. 12, 3337-3342, 1998 ; Nature Cell Biol. 2, 131-136, 2000)。上記 C E D 5 及び Myoblast City が特定タイプの細胞の運動に重要であることが突然変異体を用いた遺伝学的解析から明らかになっているが (J. Cell Biol. 138, 589-603, 1997 ; Nature 392, 501-504, 1998 ; Nature Cell Biol. 2, 131-136, 2000)、C D M ファミリータンパク質が、哺乳類において生理  
25 的にどのように機能するかは未だ不明であった。

D O C K 2 (K I A A O 2 0 9 ; DNA Res. 3, 321-329) は、ヒト造

血細胞で特異的に発現するCDMファミリータンパク質の他のメンバーをコードし、上記DOCK2が293T腎細胞においてRacに結合し、Racを活性化することが知られている(Biochem. Biophys. Acta 1452, 179-187, 1999)。一方、本発明者らは、マウス胸腺cDNAライブラリーよりCDMファミリーに属する新規遺伝子Hchを単離し、かかる遺伝子産物が1828のアミノ酸から成り、そのN末端にはSH3ドメインがコードされていることを見出した(Nature, 412, 826-831, 2001)。また、マウス組織を用いたノーザンブロット解析において、DOCK180がさまざまな臓器に発現しているのに対して、Hchの発現は胸腺及び脾臓に局限していることや、細胞株を用いた解析より2種類の変異T細胞株を除いて、Hchの発現がT細胞、B細胞、マクロファージのいずれにおいても認められることを確認した。またHchの発現を欠く変異T細胞株にHchを導入することで細胞形態の著明な変化と接着性の亢進が観察されることを明らかにしている。Hchのコードする1828アミノ酸のうち1677アミノ酸はヒトDOCK2と同一であり、HchはマウスDOCK2ホモログと考えられたが、上記DOCK2の生理的機能は不明であった。

本発明者らは、上記のようにCDMファミリーに属し、且つリンパ球特異的に発現する分子としてDOCK2を同定し、ノックアウトマウスを作製することで、この分子がリンパ球遊走に不可欠であることを明らかにした(Nature, 412, 826-831, 2001)。DOCK2欠損リンパ球では種々のケモカイン刺激によっても活性型Racは検出できない。それ故、DOCK2はRacの活性化を介してリンパ球遊走を制御していると考えられる。しかしながら、DOCK2がどのような機序でRacを活性化するか依然として不明である。Racは分子スイッチとして機能し、GDP/GTP交換因子(GEF)により活性化される。DOCK2は

R a c と結合するものの、その構造上 G E F として機能するとは考えにくい。それ故、D O C K 2 は他の分子を介して G E F をリクルートすることにより R a c を活性化していると推測される。

最近、線虫において、C D M ファミリー分子の一種である C E D - 5  
5 と会合し、細胞骨格を制御する分子である C E D - 1 2 が同定され、その哺乳類ホモログとして E L M O 1, 2, 3 が報告された (Cell, 107, 27-41, 2001)。また、G D P / G T P 交換因子 (G E F) としてこれまでに数 10 種類のもものが知られており、これら G E F の中でも、R a c 特異的な G E F として機能する分子として、胸腺腫細胞株の浸潤を規定  
10 する T i a m 1, 2 (Cell, 77, 537-549, 1994 ; Nature, 375, 338-340, 1995) や、T 細胞受容体シグナルを制御する V a v 1 (Nature, 385, 169-172, 1997) の他 V a v 2、V a v 3 や、T r i o (J. Cell Science, 113, 729-739, 2000) や、S T E F (J. Biol. Chem., 277, 2860-2868, 2002) や、P - R e x 1 (Cell, 108, 809-821, 2002) が知られており、  
15 これら 5 種類はいずれも共通のドメインをもっており、G T P を R a c に付与する機能を有している。

自己免疫疾患や移植片拒絶は、標的組織にリンパ球が浸潤することによりもたらされる。そのため、これらの疾患や病態を治療あるいは予防する上で、D O C K 2 は格好の標的分子になると考えられる。本発明の  
20 課題は、欠失変異体を用いた D O C K 2 機能ドメインの同定や、D O C K 2 及び D O C K 2 の S H 3 ドメインとの結合を干渉する物質のスクリーニング、とりわけ D O C K 2 と E L M O との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、E L M O と T i a m 等の G E F との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、これらスクリーニング方法を利用する  
25 アレルギー、自己免疫疾患、G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法等々を提供することにある。

DOCK 2はN末端のSH3ドメインを含む1828アミノ酸残基からなるリンパ球特異的に発現する分子であり、Racを活性化し、細胞骨格を制御することでリンパ球の運動性を規定している。本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、DOCK 2のSH3ドメインを含むN末端の504アミノ酸残基を欠失したDOCK 2変異体ではRac活性化能が著しく低下し、アクチン重合を惹起できないことを見出し、この領域に結合する分子としてELMO1を同定した。また、SH3ドメインの1アミノ酸変異により、DOCK 2とELMO1との結合が完全に阻害されることから、DOCK 2はSH3ドメインを介してELMO1に会合していることを見出した。さらに、ELMO1が、Rac特異的なGDP/GTP交換因子（GEF）として機能するTiam1と結合することを見出した。すなわち、DOCK 2はELMO1を介してTiam1をリクルートすることによりRacを活性化していることを見出した。したがって、DOCK 2のSH3ドメイン、ELMO1、Tiam1という分子間相互作用を阻害することで、リンパ球遊走を人為的に制御しうることを見出した。本発明は、以上の知見に基づいて完成するに至ったものである。

#### 発明の開示

すなわち本発明は、DOCK 2とELMOと被検物質とを接触させ、次いでDOCK 2とELMOとの会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK 2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項1）や、DOCK 2のSH3ドメインとELMOと被検物質とを接触させ、次いでDOCK 2のSH3ドメインとELMOとの会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK 2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項2）や、DOCK 2と

- ELMOのC末端領域と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOのC末端領域との会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2とELMOのC末端領域との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項3）や、DOCK2のSH3ドメインとELMOのC
- 5 末端領域と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2のSH3ドメインとELMOのC末端領域との会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項4）や、DOCK2若しくはそのSH3ドメイン及び／又はELMO若しくはそのC末端領域が、マーカートンパク質及び／又はペプ
- 10 チドタグと結合していることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項5）や、DOCK2若しくはそのSH3ドメインに対する抗体又はDOCK2若しくはそのSH3ドメインと融合した他のペプチドに対する抗体により分画されたDOCK2若しくはそのSH3ドメインに、
- 15 ELMO若しくはそのC末端領域に対する抗体を作用させ、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項1～5のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項6）や、GTP結合型の活性型Racを検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項1～6のいずれか記載のDO
- 20 CK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項7）や、DOCK2とELMOとの会合に干渉する物質が、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質であることを特徴とする請求項1～7のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項8）や、DOCK2とELMOとの会合に
- 25 干渉する物質が、DOCK2とELMOとの結合を阻害する物質であることを特徴とする請求項1～7のいずれか記載のDOCK2とELMO



との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項 9）や、ELMO が、ELMO 1 であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の DOCK 2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項 10）や、請求項 1 ～ 10 のいずれか記載の DOCK 2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法（請求項 11）や、請求項 1 ～ 10 のいずれか記載の DOCK 2 と ELMO との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とする Rac を活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法（請求項 12）に関する。

また本発明は、ELMO と GDP / GTP 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで ELMO と GDP / GTP 交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とする ELMO と GDP / GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項 13）や、ELMO の N 末端領域と GDP / GTP 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで ELMO の N 末端領域と GDP / GTP 交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とする ELMO と GDP / GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項 14）や、ELMO 若しくはその N 末端領域及び / 又は GDP / GTP 交換因子が、他のペプチドと融合していることを特徴とする請求項 13 又は 14 記載の ELMO と GDP / GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項 15）や、GDP / GTP 交換因子に対する抗体又は GDP / GTP 交換因子と融合した他のペプチドに対する抗体により分画された GDP / GTP 交換因子に、ELMO 若しくはその N 末端領域に対する抗体を作用させ、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項 1

- 3～15のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項16）や、GTP結合型の活性型Racを検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項13～16のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項17）や、ELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質が、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質であることを特徴とする請求項13～17のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項18）や、ELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質が、ELMOとGDP/GTP交換因子との結合を阻害する物質であることを特徴とする請求項13～17のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項19）や、ELMOが、DOCK2と結合したELMOであることを特徴とする請求項13～19のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項20）や、ELMOが、ELMO1であることを特徴とする請求項13～20のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項21）や、GDP/GTP交換因子が、Rac特異的なGDP/GTP交換因子であることを特徴とする請求項13～21のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項22）や、Rac特異的なGDP/GTP交換因子がTiam1であることを特徴とする請求項22記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法（請求項23）や、請求項13～23のいずれか記載のELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉する物質のスクリー

ーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、  
G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法（請求  
項 2 4）や、請求項 1 3 ～ 2 3 のいずれか記載の E L M O と G D P / G  
T P 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用する  
5 ことを特徴とする R a c を活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リ  
ンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法（請求項 2 5）  
に関する。

さらに本発明は、D O C K 2 と E L M O と G D P / G T P 交換因子と  
被検物質とを接触させ、次いで D O C K 2 と E L M O との会合形成の程  
10 度、あるいは、E L M O と G D P / G T P 交換因子との会合形成の程度  
を評価することを特徴とする R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスク  
リーニング方法（請求項 2 6）や、D O C K 2 の S H 3 ドメインと E L  
M O と G D P / G T P 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで D O C  
K 2 の S H 3 ドメインと E L M O との会合形成の程度、あるいは、E L  
15 M O と G D P / G T P 交換因子との会合形成の程度を評価することを特  
徴とする R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請  
求項 2 7）や、G T P 結合型の活性型 R a c を検出することにより、会  
合形成の程度を評価することを特徴とする請求項 2 6 又は 2 7 記載の R  
a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 2 8）  
20 や、E L M O が、D O C K 2 と結合した E L M O であることを特徴とす  
る請求項 2 6 ～ 2 8 のいずれか記載の R a c 活性化促進物質又は抑制物  
質のスクリーニング方法（請求項 2 9）や、E L M O が、E L M O 1 で  
あることを特徴とする請求項 2 6 ～ 2 9 のいずれか記載の R a c 活性化  
促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 3 0）や、G D P  
25 / G T P 交換因子が、R a c 特異的な G D P / G T P 交換因子であるこ  
とを特徴とする請求項 2 6 ～ 3 0 のいずれか記載の R a c 活性化促進物

質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 3 1）や、R a c 特異的な G D P / G T P 交換因子が T i a m 1 であることを特徴とする請求項 3 1 記載の R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 3 2）や、請求項 2 6 ～ 3 2 のいずれか記載の R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするリンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質の探索方法（請求項 3 3）や、請求項 2 6 ～ 3 2 のいずれか記載の R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法（請求項 3 4）や、請求項 2 6 ～ 3 2 のいずれか記載の R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とする R a c を活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法（請求項 3 5）や、請求項 1 1、2 4 又は 3 4 記載の探索方法により得られることを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬（請求項 3 6）や、請求項 1 2、2 5 又は 3 5 記載の探索方法により得られることを特徴とする R a c を活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬（請求項 3 7）や、S H 3 ドメインを含む D O C K 2 の N 末端領域を標的とし、D O C K 2 の S H 3 ドメインと該 S H 3 ドメイン結合タンパク質と被検物質とを接触させ、次いで D O C K 2 と S H 3 ドメイン結合タンパク質との会合形成の程度を評価することを特徴とする D O C K 2 機能阻害物質のスクリーニング方法（請求項 3 8）や、完全長 D O C K 2 及び D O C K 2 欠失変異体を発現する遺伝子導入細胞株を用い、これらの細胞株における R a c 活性化の程度を測定・評価し、D O C K 2 の機能ドメインを同定し、該機能ドメインと会合する機能ドメイ

ン会合分子を探索し、D O C K 2 の機能ドメインと機能ドメイン会合分子と被検物質とを接触させ、D O C K 2 の機能ドメインと機能ドメイン会合分子との会合形成の程度を評価することを特徴とするD O C K 2 機能阻害物質のスクリーニング方法（請求項 3 9）に関する。

5

#### 図面の簡単な説明

第 1 図は、D O C K 2 がその N 末端の領域で E L M O 1 と結合することを示す図である。

10 A は、D O C K 2 及び D O C K 2 欠失変異体の構造を模式的に示す図である。図中、黒塗りは S H 3 ドメインである。

B は、2 9 3 T 細胞に D O C K 2 あるいは D O C K 2 欠失変異体をコードする遺伝子を、P c D N A E L M O 1 - V 5 と共にトランスフェクトし、4 8 時間後に細胞を回収し、免疫沈降及びウェスタンブロット法を用いて E L M O 1 との結合を解析した図である。左側に解析に供した  
15 サンプルの種類、免疫沈降及びウェスタンブロットに用いた抗体を示す。

第 2 図は、E L M O 1 との結合に重要な N 末端領域を欠失した D O C K 2  $\Delta$  N では R a c 活性化能が顕著に低下し、アクチン重合を誘導できないことを示す写真である。

A は、B E  $\alpha$  1 6 - 3、N 3 - 5、及び遺伝子導入細胞株（1 7 - 1 1、  
20 8 4 - 3）における D O C K 2 あるいは D O C K 2  $\Delta$  N の発現を、D O C K 2 に対するポリクロナール抗体を用いたウェスタンブロット法にて解析した写真である。図中、N S は非特異的なバンドを示す。

B は、8 4 - 3、1 7 - 1 1、B E  $\alpha$  1 6 - 3 の細胞抽出液を P A K 1 R a c 結合ドメインの G S T 融合タンパク質でプルダウンし、抗 R a c 抗体で染色することにより活性型 R a c を検出した写真である。  
25

C は、B E  $\alpha$  1 6 - 3、1 7 - 1 1、8 4 - 3 を propidium iodide 及び

ファロイジン (phalloidin) で染色することで細胞の極性化及びアクチン重合につき検討した写真である。

第3図は、DOCK 2 がその SH 3 ドメインを介して E L M O 1 と会合することを示す図である。

- 5 Aは、DOCK 2 SH 3 ドメインを含む 1 0 - 8 9 のアミノ配列を示す図である。グルタミン酸に置換したアミノ酸残基を太字で示す。
- Bは、2 9 3 T細胞にDOCK 2あるいはDOCK 2 SH 3 変異体をコードする遺伝子を、P c D N A E L M O 1 - V 5 と共にトランスフェクトし、4 8 時間後に細胞を回収し、免疫沈降及びウェスタンブロット
- 10 法を用いてE L M O 1 との結合を解析した図である。左側に解析に供したサンプルの種類、免疫沈降及びウェスタンブロットに用いた抗体を示す。

第4図は、E L M O 1 がそのC末端の領域でDOCK 2 に結合していることを示す図である。

- 15 Aは、E L M O 1 及びこの実験で使用したE L M O 1 欠失変異体の構造を模式的に示す図である。
- Bは、2 9 3 T細胞にE L M O 1 及びE L M O 1 欠失変異体をコードする遺伝子を、P c D N A D O C K 2 - H A あるいはコントロールベクターと共にトランスフェクトし、4 8 時間後に細胞を回収し免疫沈降及びウェスタンブロット法を用いてD O C K 2 との結合を解析した図である。左側に解析に供したサンプルの種類、免疫沈降及びウェスタンブロットに用いた抗体を示す。
- 20

第5図は、E L M O 1 がそのN末端の領域でT i a m 1 に結合していることを示す図である。

- 25 Aは、E L M O 1 及びこの実験で使用したE L M O 1 欠失変異体の構造を模式的に示す図である。

Bは、293T細胞にELMO1及びELMO1欠失変異体をコードする遺伝子を、PCI Tiam1-HAあるいはコントロールベクターと共にトランスフェクトし、48時間後に細胞を回収し免疫沈降及びウェスタンブロット法を用いてTiam1との結合を解析した図である。左  
5 側に解析に供したサンプルの種類、免疫沈降及びウェスタンブロットに用いた抗体を示す。

第6図は、DOCK2によるRac活性化機構の模式図である。

DOCK2はELMO1を介して、RacのGEFとして機能するTiam1をリクルートすることでRacを活性化することを示す図である。

10

発明を実施するための最良の形態

本発明のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法としては、DOCK2とELMOと被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOとの会合形成の程度を評価する方法や、DO  
15 CK2のSH3ドメインとELMOと被検物質とを接触させ、次いでDOCK2のSH3ドメインとELMOとの会合形成の程度を評価する方法や、DOCK2とELMOのC末端領域と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOのC末端領域との会合形成の程度を評価する方法や、DOCK2のSH3ドメインとELMOのC末端領域と被検物  
20 質とを接触させ、次いでDOCK2のSH3ドメインとELMOのC末端領域との会合形成の程度を評価する方法であれば、特に制限されるものではなく、上記、DOCK2若しくはそのSH3ドメイン及び／又はELMO若しくはそのC末端領域として、これらとマーカータンパク質及び／又はペプチドタグとが結合した融合タンパク質又は融合ペプチド  
25 として用いてもよい。また、上記ELMOとしては、ELMO1、ELMO2、ELMO3を具体的に挙げるができるが、中でもELMO

1を好適に例示することができる。

上記DOCK2のSH3ドメインとしては、ELMOと会合しうる機能を有するDOCK2の変異体で、DOCK2のSH3ドメインの全部又は一部を含むペプチドを例示することができ、具体的には、DOCK  
5 2の1位から502位のアミノ酸残基からなるDOCK2Nや、DOCK2の1位から1311位のアミノ酸残基からなるDOCK2ΔCを挙げることができる。また、上記ELMOのC末端領域としては、DOCK2のSH3ドメインと会合しうる機能を有するELMOの変異体で、ELMOのC末端領域の全部又は一部を含むペプチドを例示することが  
10 でき、具体的には、ELMO1の147位から727位のアミノ酸残基からなるELMO1-de11や、ELMO1の345位から727位のアミノ酸残基からなるELMO1-de18を挙げることができる。以下、DOCK2と上記DOCK2のSH3ドメインを合わせて「DOCK2等」、ELMO1などのELMOと上記ELMOのC末端領域を合  
15 わせて「ELMO等」ということがある。

上記DOCK2変異体やELMO変異体は、DOCK2遺伝子やELMO遺伝子を常法により改変することにより調製することができる。DOCK2遺伝子としては、Hch（マウスDOCK2）遺伝子（Gen BankアクセッションナンバーAY027438；Nature, Vol412,  
20 23 August, 826-831, 2001）、ヒトDOCK2遺伝子（XM\_047961；DNA Res. 3, 321-329）を具体的に挙げることができるが、DOCK2遺伝子の由来はマウス及びヒト等に限られるものではない。また、ELMO1などのELMO遺伝子としては、マウスELMO1遺伝子（AF398883；Cell, Vol.107 (1), 27-41, 2001）、ヒトELMO1遺伝  
25 子（AF398885；Cell, Vol.107 (1), 27-41, 2001）の他、ELMO2遺伝子（ヒトAF398886、マウスAF398884）、ELMO



3 遺伝子 (ヒト NM\_024712) を具体的に挙げるができるが、  
DOCK2 遺伝子や ELMO 遺伝子の由来はマウス及びヒト等に限られ  
るものではない。なお、マウス DOCK2 のアミノ酸配列については配  
列番号 1 に、ヒト DOCK2 のアミノ酸配列については配列番号 2 に、  
5 マウス ELMO1 のアミノ酸配列については配列番号 3 に、ヒト ELMO1  
のアミノ酸配列については配列番号 4 に示す。

上記 DOCK2 等や ELMO 等と、マーカートンパク質及び／又はペ  
プチドタグとが結合している融合タンパク質や融合ペプチドにおける、  
マーカートンパク質としては、従来知られているマーカートンパク質で  
10 あれば特に制限されるものではなく、例えば、アルカリフォスファター  
ゼ、抗体の Fc 領域、HRP、GFP などを具体的に挙げることができ、  
またペプチドタグとしては、HA、FLAG、Myc 等のエピトープタ  
グや、GST、マルトース結合タンパク質、ビオチン化ペプチド、オリ  
ゴヒスチジン等の親和性タグなどの従来知られているペプチドタグを具  
15 体的に例示することができる。かかる融合タンパク質や融合ペプチドは、  
常法により作製することができ、HA タグに対する特異抗体を利用して、  
DOCK2 等や ELMO1 等と HA タグとの融合タンパク質や融合ペプ  
チドを分離・分画することができる。

DOCK2 と ELMO1 などの ELMO との会合に干渉する物質のスク  
リーニング方法において、DOCK2 等と ELMO 等と被検物質とを  
20 接触させる方法としては、DOCK2 等と ELMO 等との会合形成の程  
度を評価することができる接触方法であれば特に制限されるものではな  
く、セルフリー系で被検物質の存在下、DOCK2 等と ELMO 等とを  
接触させる方法や、DOCK2 等発現細胞に、ELMO 等や ELMO 等  
25 をコードする遺伝子がインテグレートされた発現ベクターを被検物質と  
共に導入する方法や、ELMO 等発現細胞に、DOCK2 等や DOCK

2等をコードする遺伝子がインテグレートされた発現ベクターを被検物質と共に導入する方法や、D O C K 2等・E L M O等非発現細胞に、D O C K 2等やD O C K 2等をコードする遺伝子がインテグレートされた発現ベクターと、E L M O等やE L M O等をコードする遺伝子がインテグレートされた発現ベクターと、被検物質とを導入する方法を挙げることができる。

上記被検物質との接触のために用いられる細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真核細胞や、ドロソフィラ S 2、スポドプテラ S f 9等の昆虫細胞や、L細胞、C H O細胞、C O S細胞、H e L a細胞、C 1 2 7細胞、B A L B / c 3 T 3細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、B H K 2 1細胞、H E K 2 9 3細胞、B o w e sメラノーマ細胞、卵母細胞等の動植物細胞などを挙げることができるが、動物細胞が好ましい。また、かかる細胞内にD O C K 2等やE L M O等を導入する方法としては、上記の遺伝子を導入する方法の他に、巨大分子と非共有結合体を形成し、タンパク質等の巨大分子の構造を変化させ、タンパク質等の巨大分子を細胞内にデリバリーすることができる Chariot (Active Motif 社製) 等の細胞毒性のない試薬を用いることもできる。

また、上記発現ベクターとしては、動物細胞用発現ベクターが好ましく、かかる動物細胞用発現ベクターとしては、例えば、染色体、エピソード及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、S V 4 0のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コ

スミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げるができる。これら発現系は、発現を起こさせるだけでなく、発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

また、動物細胞用発現ベクターに代えてリポソームを用いることもでき

る。そして、かかる動物細胞用発現ベクターの細胞への導入は、Davis  
ら (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986) 及び  
Sambrook ら (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL,  
2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,  
N.Y., 1989) などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、

例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレイプローディング (scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。

本発明のDOCK2とELMO1などのELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法において、DOCK2等とELMO等との会合形成の程度を評価する方法としては、分離・分画されたDOCK2等にELMO等に対する抗体を作用させ、あるいは、分離・分画されたELMO等にDOCK2等に対する抗体を作用させ、DOCK2等とELMO等との会合形成の程度を免疫化学的に測定・評価する方法を挙げることができ、DOCK2等やELMO等を分離・分画するには、DOCK2等やELMO等に対する特異抗体、タグ特異的抗体を用いることができる。また、タンパク質-タンパク質間の相互作用を微量のタンパク質を用いてかつ標識することなく検出できる酵母の two hybrid system や、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが

できる表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーや、立体構造の変化を検出できるNMR法を使用して、その会合形成の程度を測定・評価する方法を挙げることができる。その他、大腸菌発現系を用いた far western 法、アフィニティークロマトグラフィーを利用する方法等の公知  
5 の相互作用するタンパク質の探索法を好適に例示することができる。

本発明のDOCK 2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法において、DOCK 2等とELMO等との会合形成の程度を評価するもう一つの方法として、GTP結合型の活性型Racを検出する評価方法を挙げることができる。活性型Racの検出には、PAK1 Rac  
10 a c結合ドメインのGST融合タンパク質を用いたプルダウン法を用いることができる。

本発明のDOCK 2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法における被検試料としては、例えばペプチド、タンパク質、合成化合物、微生物発酵物、海洋生物抽出物、植物抽出物、原核細胞抽出物、真核単細胞抽出物又は動物細胞抽出物あるいはそれらのライブラリ  
15 ーを挙げることができる。また、本発明のDOCK 2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法において、コントロール実験を併用することができる。コントロールとしては、DOCK 2等とELMO等との会合形成に影響を及ぼすことのないネガティブコントロール、  
20 及び／又はDOCK 2等とELMO等との会合形成に影響を及ぼすポジティブコントロールを用いることができる。

上記DOCK 2とELMOとの会合に干渉する物質としては、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質、特にDOCK 2とELMOとの結合を阻害する物質等のリンパ球遊走制御機能の抑制物質を挙げること  
25 ができる。リンパ球遊走制御機能としては、DOCK 2遺伝子の発現に依拠するリンパ球の運動性を制御する機能であれば特に制限されるも

のではないが、R a cを活性化してR a c-G T P結合体とし、細胞骨格の再構築、特にリンパ球におけるアクチン重合を促進する機能や、S L C、S D F-1、B L C等のケモカイン刺激によるリンパ球の遊走機能や、脾臓、リンパ節、パイエル板等の2次リンパ組織へのホーミング機能や、E L Cケモカイン刺激に対する成熟胸腺T細胞の末梢血中への移出機能や、S D F-1ケモカイン刺激に対するC D 4<sup>+</sup>C D 8<sup>+</sup>未熟胸腺細胞の遊走機能等を具体的に例示することができる。

本発明はまた、E L M OとG D P/G T P交換因子(G E F)との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、R a c活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法に関する。E L M OとG E Fとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法としては、E L M OとG E Fと被検物質とを接触させ、次いでE L M OとG E Fとの会合形成の程度を評価する方法や、E L M OのN末端領域とG E Fと被検物質とを接触させ、次いでE L M OのN末端領域とG E Fとの会合形成の程度を評価する方法であれば特に制限されるものではなく、また、R a c活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法としては、D O C K 2とE L M OとG E Fと被検物質とを接触させ、あるいは、D O C K 2のS H 3ドメインとE L M OとG E Fと被検物質とを接触させ、次いでD O C K 2とE L M Oとの会合形成の程度、あるいは、E L M OとG E Fとの会合形成の程度を評価する方法であれば特に制限されるものではなく、上記E L M Oとして、D O C K 2と結合したE L M Oを用いることもできる。

上記E L M Oとしては、E L M O 1、E L M O 2、E L M O 3を具体的に挙げるができるが、中でもE L M O 1を好適に例示することができ、また、上記G E Fとしては、T i a m 1、T i a m 2、V a v 1、V a v 2、V a v 3、T r i o、S T E F、P-R e x 1などのR a c特異的なG D P/G T P交換因子が好ましく、中でもT i a m 1を好適

に例示することができる。上記 T i a m 1 遺伝子としては、マウス T i a m 1 遺伝子 (NM\_009384 ; Cell, Vol.77 (4), 537-549, 1994)、ヒト T i a m 1 遺伝子 (NM\_003253 ; Oncogene Vol. 10(7), 1371-1376, 1995) を具体的に挙げるができるが、T i a m 1 遺伝子  
5 子の由来はマウス及びヒト等に限られるものではない。なお、マウス T i a m 1 のアミノ酸配列を配列番号 5 に、ヒト T i a m 1 のアミノ酸配列を配列番号 6 に示す。

上記 E L M O と G E F との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法における、  
10 E L M O と G E F との会合形成の程度を評価する方法、D O C K 2 と E L M O との会合形成の程度を評価する方法、他のペプチドと融合している E L M O 又はその N 末端領域や G E F を用いる方法などを含め、前記 D O C K 2 と E L M O との会合に干渉する物質のスクリーニング方法における手法を準用することができる。

15 以上の本発明の D O C K 2 と E L M O 1 など E L M O との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、E L M O と G E F との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、R a c 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法、特にリンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用すると、D O C K 2 を標的としたアレルギー、自己免疫疾患、G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する予防・治療薬のスクリーニングが可能となる。例えば、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法により得られる抗 D O C K 2 S H 3 ドメイン抗体、D O C K 2 S H 3 ドメイン結合分子(低分子化合物を含む)、D O C K 2 遺伝子のアンチセンス鎖、E L M O 1 など  
20 E L M O の C 末端領域の D O C K 2 S H 3 ドメイン結合部位を特異的に認識する抗体、E L M O 1 など E L M O の C 末端領域の D O C K 2

- SH3ドメイン結合部位に結合する分子（低分子化合物を含む）、ELMO1などELMOのN末端領域のTiam1などGEF結合部位を特異的に認識する抗体、ELMO1などELMOのN末端領域のTiam1などGEF結合部位に結合する分子（低分子化合物を含む）、ELMO1
- 5 などELMOのアンチセンス鎖等のリンパ球遊走制御機能の抑制物質は、リンパ球の運動性を人為的に抑制しうることが期待されることから、アレルギー、自己免疫疾患、GVH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬となりうる可能性がきわめて大きい。かかる治療薬を医薬品として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、
- 10 賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができ、通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる。
- 15 また、本発明のDOCK2とELMO1との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、ELMO1とTiam1との会合に干渉する物質のスクリーニング方法や、Rac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法、特にリンパ球遊走制御機能の促進物質のスクリーニング方法を利用すると、Racを活性化して細胞骨格の再構築を促進しうることから、リンパ球遊走抑制に起因する疾病、例えば、各種癌や、薬剤・放射線照射によって引き起こされる免疫不全症などに対する予防・治療薬のスクリーニングが可能となる。
- 20

さらに、本発明のDOCK2機能阻害物質のスクリーニング方法としては、SH3ドメインを含むDOCK2のN末端領域を標的とし、DOCK2のSH3ドメインと該SH3ドメイン結合タンパク質と被検物質

25 とを接触させ、次いでDOCK2とSH3ドメイン結合タンパク質との

会合形成の程度を評価する方法や、完全長DOCK2及びDOCK2欠失変異体を発現する遺伝子導入細胞株を用い、これらの細胞株におけるRac活性化の程度を測定・評価し、DOCK2の機能ドメインを同定し、該機能ドメインと会合する機能ドメイン会合分子を探索し、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子と被検物質とを接触させ、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子との会合形成の程度を評価する方法を挙げることができ、被検物質と接触させる方法や会合形成の程度を評価する方法やRac活性化の程度を測定方法などは、上述した方法を用いることができ、DOCK2の機能ドメインの同定方法や完全長DOCK2及びDOCK2欠失変異体を発現する遺伝子導入細胞株の作製は以下の実施例記載の方法を用いることができる。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

#### 実施例1 (DOCK2のN末端の領域とELMO1との結合)

線虫において最近CED-5と会合し、細胞骨格を制御する分子としてCED-12が同定され、その哺乳類ホモログとしてELMO1が報告された(Cell 107, 27-41, 2001)。そこで、DOCK2とELMO1とが結合するか否かを検討するために、PcDNA/His max ベクター (Invitrogen 社製) を用いてC末端にHAタグ (YPYDVPDYA: 配列番号7) を挿入した完全長DOCK2あるいは種々のDOCK2欠失変異体をコードする遺伝子コンストラクト (PcDNA DOCK2-HA、PcDNA DOCK2 N-HA、PcDNA DOCK2 ΔC-HA、PcDNA DOCK2 ΔN-HA) を構築し、PcDNA V5-His ベクター (Invitrogen 社) にELMO1 cDNAを挿入した遺伝子 (PcDNA ELMO1-V5) と共に293T細胞 (九州大学 畠山鎮次博士より分与) に遺伝子導入した。DOCK2コンストラクト



は本発明者らが単離した遺伝子 (Nature, 412, 826-831, 2001) より、E L M O 1 コンストラクトはマウス組織 c D N A より P C R 法を用いて常法により作製した。使用した D O C K 2 欠失変異体をコードする遺伝子は以下の通りであり、これを図 1 A に模式的に示す。

- 5 1) P c D N A D O C K 2 N - H A ; D O C K 2 の 1 位から 5 0 2 位のアミノ酸残基をコードする遺伝子
- 2) P c D N A D O C K 2 Δ C - H A ; D O C K 2 の 1 位から 1 3 1 1 位のアミノ酸残基をコードする遺伝子
- 3) P c D N A D O C K 2 Δ N - H A ; D O C K 2 の 5 0 5 位から 1 8 2 8 位のアミノ酸残基をコードする遺伝子

遺伝子導入後 4 8 時間で細胞を回収し、Lysis buffer (Cell signaling 社製) で溶解した後、total cell lysate 及び抗 H A 抗体 (Roche 社製) による免疫沈降物を対象に抗 V 5 抗体 (Invistorgen 社製) を用いたウェスタンブロット法にて解析した。total cell lysate ではいずれも抗 V 5 抗体で E L M O 1 に相当する約 1 0 0 K D のバンドが検出された (図 1 B ; 上段)。しかしながら、免疫沈降物においては、完全長 D O C K 2 、 D O C K 2 Δ C 、 D O C K 2 N をコードする遺伝子を導入した場合 E L M O 1 に相当するバンドが認められたが、D O C K 2 の N 末端 5 0 4 位までのアミノ酸残基を欠く D O C K 2 Δ N を発現させた場合は検出できなかった (図 1 B ; 中段下段)。このことから、D O C K 2 はその N 末端の 5 0 2 個のアミノ酸残基の領域で E L M O 1 と会合することが明らかとなった。

#### 実施例 2 (N 末端領域を欠失した D O C K 2 Δ N での R a c の活性化)

E L M O 1 との会合が D O C K 2 の機能にどのような影響を及ぼすかを検討するため、P B J 1 ベクターを用いて完全長 D O C K 2 及び D O C K 2 の N 末端 5 0 4 アミノ酸残基を欠失した変異体 (D O C K 2 Δ N)

をコードする遺伝子コンストラクトを構築し、これらをDOCK2遺伝子の発現を欠くT細胞株BE $\alpha$ 16-3 (National Jewish Center of Philippa Marrack 博士より分与) に導入した安定遺伝子導入細胞株を樹立した。N3-5はDOCK2を発現する野生型T細胞株であり、17-11 (Nature, 412, 826-831, 2001) 及び84-3は本発明者らが樹立した、それぞれ完全長DOCK2あるいはDOCK2 $\Delta$ Nを発現する遺伝子導入細胞株である。本発明者らが作製した抗DOCK2ポリクロナール抗体を用いたウェスタンブロット解析において、17-11と84-3におけるDOCK2及びDOCK2 $\Delta$ Nの発現はほぼ同程度であった (図2A参照。)。そこで17-11と84-3を対象に、これらの細胞株におけるRac活性化をPAK1 Rac結合ドメインのGST融合タンパク質を用いたプルダウン法にて比較解析した。完全長DOCK2を発現する17-11においてはGTP結合型の活性型Racが容易に検出できたが、ELMO1との結合部位を欠くDOCK2 $\Delta$ Nを発現する84-3ではRac活性化能が顕著に低下していた (図2B参照。)。17-11と84-3をPI (propidium iodide) で核染色したところ、親株であるBE $\alpha$ 16-3と異なり、いずれにおいても核が偏在する一すなわち細胞の極性化が起こっているという所見が得られた (図2C; 上段参照。)。しかしながら、これらの細胞をF-アクチンのプローブであるファロイジンで染色した場合、アクチン重合は17-11においてのみ認められ、84-3ではDOCK2の発現を欠くBE $\alpha$ 16-3と同様全く検出されなかった (図2C; 下段参照。)。このことから、DOCK2とELMO1との会合はRacのfull activationにも、それに伴う細胞骨格の再構築にも極めて重要であることが示唆された。以上のことから、ELMO1との結合に重要なN末端領域を欠失したDOCK2 $\Delta$ NではRac活性化能が顕著に低下し、アクチン重合を誘導できない

ことがわかった。

### 実施例 3 (DOCK 2 の SH 3 ドメインを介しての ELMO 1 との会合)

DOCK 2 は N 末端にはタンパク質-タンパク質相互作用に関与することが知られている SH (Src-homology) 3 ドメインがコードされている。DOCK 2 の N 末端の 502 個のアミノ酸残基が ELMO 1 との会合に重要であることを見出したので、これが SH 3 ドメインを介したものであるのかどうかにつき検討を加えた。SH 3 ドメインには共通して保存されたアミノ酸残基が存在している。そこで、PcDNA/His max ベクターを用いて C 末端に HA タグを挿入した種々の DOCK 2 SH 3 変異体をコードする遺伝子コンストラクトを構築し、PcDNA ELMO 1-V5 と共に 293T 細胞に遺伝子導入することで図 1B と同様に解析した。DOCK 2 SH 3 変異体をコードする遺伝子は以下のとおりである。

1) PcDNA L27E-HA ; DOCK 2 の 27 位のロイシンをグルタミン酸に置換した変異体をコードする遺伝子

2) PcDNA G32E-HA ; DOCK 2 の 32 位のグリシンをグルタミン酸に置換した変異体をコードする遺伝子

3) PcDNA P60E-HA ; DOCK 2 の 60 位のプロリンをグルタミン酸に置換した変異体をコードする遺伝子

4) PcDNA F63E-HA ; DOCK 2 の 63 位のフェニルアラニンをグルタミン酸に置換した変異体をコードする遺伝子

DOCK 2 SH 3 ドメインを含む 10 位から 89 位までのアミノ酸配列を図 3A に示す。total cell lysate においてはいずれも抗 V5 抗体で ELMO 1 に相当する約 100 KD のバンドが検出された (図 3B ; 上段)。しかしながら抗 HA 抗体を用いた免疫沈降物を対象とした場合、ELMO 1 に相当するバンドは PcDNA DOCK 2-HA 及び PcD

NA L 2 7 E-HAを導入した以外では検出できなかった（図 3 B ; 中段）。一方、いずれの遺伝子を導入した場合でもDOCK 2 及びDOCK 2 SH 3 変異体の発現は同程度であった（図 3 B ; 下段）。以上の結果は、SH 3 ドメインの1 アミノ酸置換でDOCK 2 とELMO 1 との  
 5 会合が完全に阻害されることを示すものであり、これらのことから、DOCK 2 はそのSH 3 ドメインを介してELMO 1 に結合していることが明らかとなった。

#### 実施例 4（ELMO 1 のC末端領域とDOCK 2 との結合）

次にDOCK 2 と結合するELMO 1 の機能ドメインを同定するため、  
 10 PcDNA V5His ベクターを用いて、種々のELMO 1 欠失変異体をコードする遺伝子コンストラクトを構築し、PcDNA DOCK 2-HA と共に293T細胞に遺伝子導入することで解析した。ここで使用したELMO 1 欠失変異体をコードする遺伝子は以下の通りであり、これを図 4 A に模式的に示す。

15 1) PcDNA ELMO 1-de11-V5 ; ELMO 1 の147 位から727 位までのアミノ酸残基をコードする遺伝子

2) PcDNA ELMO 1-de18-V5 ; ELMO 1 の345 位から727 位までのアミノ酸残基をコードする遺伝子

3) PcDNA ELMO 1-de110-V5 ; ELMO 1 の1 位から613 位までのアミノ酸残基をコードする遺伝子  
 20

total cell lysate においてはいずれも抗V5抗体でELMO 1 もしくはその欠失変異体に相当するバンドが検出された（図 4 B ; 上段）。しかしながら、抗HA抗体による免疫沈降物においては、抗V5抗体に反応するバンドは完全長ELMO 1、ELMO 1-de11及びELMO 1-de18をコードする遺伝子を導入した場合には認められるものの、  
 25 ELMO 1 の614 位から727 位までのアミノ酸残基を欠くPcDN

A E L M O 1 - d e l 1 0 を発現させた場合は検出できなかった (図 4 B ; 中段、下段)。このことから、E L M O 1 の 6 1 4 位から 7 2 7 位までのアミノ酸残基を含む C 末端の領域が D O C K 2 S H 3 ドメインとの会合に重要であることが示された。これらのことから、E L M O 1 はその C 末端の領域で D O C K 2 に結合していることがわかった。

#### 実施例 5 (E L M O 1 の N 末端領域と T i a m 1 との結合)

T i a m 1 は胸腺腫細胞株の浸潤を規定する分子として同定されたものであり、R a c 特異的な G D P / G T P 交換因子 (G E F) として機能することが知られている (Cell 77, 537-549, 1994、Nature 375, 338-340, 1995)。D O C K 2 と E L M O 1 との会合が R a c の full activation に必要であることから、D O C K 2 は E L M O 1 を介して T i a m 1 をリクルートしているという可能性が考えられた。この仮説を検証するために、マウス組織 c D N A より P C R 法を用いて増幅した T i a m 1 遺伝子を基に、P C I ベクター (Promega 社製) を用いて、C 末端に H A タグを挿入した T i a m 1 をコードするコンストラクト (P C I T i a m 1 - H A) を構築し、完全長 E L M O あるいは種々の E L M O 1 欠失変異体をコードする遺伝子 (P c D N A E L M O 1 - V 5、P c D N A E L M O 1 - d e l P H - V 5、P c D N A E L M O 1 - d e l 8 - V 5、P c D N A E L M O 1 - d e l 1) と共に 2 9 3 T 細胞に遺伝子導入し解析した。P c D N A E L M O 1 - d e l P H - V 5 は E L M O 1 の 1 位から 5 6 5 位までと 6 9 5 位から 7 2 7 位までのアミノ酸残基をコードする遺伝子であり、ここで使用した E L M O 1 欠失変異体を図 5 A に模式的に示す。total cell lysate においてはいずれも抗 V 5 抗体で E L M O 1 もしくはその欠失変異体に相当するバンドが検出された (図 5 B ; 上段)。抗 H A 抗体による免疫沈降物においても P c D N A E L M O 1 - V 5 及び P c D N A E L M O 1 - d e l P H

—V5を導入した場合、抗V5抗体に反応するバンドが検出された（図5B；中段、下段）。このことは、Tiam1とELMO1とが結合するということを示している。しかしながら、ELMO1のN末端の146位まであるいは344位までのアミノ酸残基を欠失させた変異体ではこの  
5 のような結合は認められず（図5B；中段、下段）、これらのことから、ELMO1はそのN末端でTiam1と会合していることが示された。

以上より、1）DOCK2はSH3ドメインを介してELMO1のC末端の領域に結合すること、2）ELMO1はそのN末端の領域を介してTiam1と結合すること、3）ELMO1と結合できないDOCK  
10 2変異体ではRac活性化能が著しく低下することが明らかとなった。このことから、DOCK2はELMO1を介して、RacのGEFとして機能するTiam1をリクルートすることによりRacを活性化していることが示された（図6）。

自己免疫疾患や移植片拒絶は、標的組織にリンパ球が浸潤することによって惹起されるため、これら疾患や病態を治療あるいは予防する上で  
15 DOCK2シグナル伝達は格好の標的となる。今回の知見は、DOCK2、ELMO1、Tiam1という分子間相互作用が細胞運動に不可欠なRac活性化を制御しているということを示すものであり、これらの分子間相互作用を遮断することでリンパ球浸潤を阻止し得るものと考え  
20 られる。それ故、これら分子間相互作用は自己免疫疾患や移植片拒絶の治療法や予防法の開発に向け今後の創薬の標的になるものと期待される。

#### 発明の効果

本発明によれば、DOCK2の分子間相互作用を解明し、DOCK2  
25 を標的としたリンパ球遊走制御物質及びリンパ球遊走制御方法を提供することができる。また、本発明によれば、DOCK2の分子間相互作用

を阻害することによる、自己免疫疾患や移植片拒絶反応の予防薬又は治療薬を提供することができる。

## 請求の範囲

1. DOCK2とELMOと被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOとの会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法。  
5
2. DOCK2のSH3ドメインとELMOと被検物質とを接触させ、次いでDOCK2のSH3ドメインとELMOとの会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法。
- 10 3. DOCK2とELMOのC末端領域と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とELMOのC末端領域との会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2とELMOのC末端領域との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。
4. DOCK2のSH3ドメインとELMOのC末端領域と被検物質  
15 とを接触させ、次いでDOCK2のSH3ドメインとELMOのC末端領域との会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法。
5. DOCK2若しくはそのSH3ドメイン及び／又はELMO若しくはそのC末端領域が、マーカートンパク質及び／又はペプチドタグと  
20 結合していることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法。
6. DOCK2若しくはそのSH3ドメインに対する抗体又はDOCK2若しくはそのSH3ドメインと融合した他のペプチドに対する抗体により分画されたDOCK2若しくはそのSH3ドメインに、ELMO  
25 若しくはそのC末端領域に対する抗体を作用させ、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項1～5のいずれか記載のDOCK2とE



LMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

7. GTP結合型の活性型Racを検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項1～6のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

5 8. DOCK2とELMOとの会合に干渉する物質が、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質であることを特徴とする請求項1～7のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

10 9. DOCK2とELMOとの会合に干渉する物質が、DOCK2とELMOとの結合を阻害する物質であることを特徴とする請求項1～7のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

15 10. ELMOが、ELMO1であることを特徴とする請求項1～9のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

11. 請求項1～10のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法。

20 12. 請求項1～10のいずれか記載のDOCK2とELMOとの会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするRacを活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法。

25 13. ELMOとGDP/GTP交換因子と被検物質とを接触させ、次いでELMOとGDP/GTP交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とするELMOとGDP/GTP交換因子との会合に干渉

する物質のスクリーニング方法。

14. E L M OのN末端領域とG D P / G T P交換因子と被検物質とを接触させ、次いでE L M OのN末端領域とG D P / G T P交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とするE L M OとG D P / G T P交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

15. E L M O若しくはそのN末端領域及び／又はG D P / G T P交換因子が、他のペプチドと融合していることを特徴とする請求項13又は14記載のE L M OとG D P / G T P交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

16. G D P / G T P交換因子に対する抗体又はG D P / G T P交換因子と融合した他のペプチドに対する抗体により分画されたG D P / G T P交換因子に、E L M O若しくはそのN末端領域に対する抗体を作用させ、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項13～15のいずれか記載のE L M OとG D P / G T P交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

17. G T P結合型の活性型R a cを検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項13～16のいずれか記載のE L M OとG D P / G T P交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

18. E L M OとG D P / G T P交換因子との会合に干渉する物質が、リンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質であることを特徴とする請求項13～17のいずれか記載のE L M OとG D P / G T P交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

19. E L M OとG D P / G T P交換因子との会合に干渉する物質が、E L M OとG D P / G T P交換因子との結合を阻害する物質であることを特徴とする請求項13～17のいずれか記載のE L M OとG D P / G

TP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

20. ELMO が、DOCK2 と結合した ELMO であることを特徴とする請求項 13～19 のいずれか記載の ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

5 21. ELMO が、ELMO1 であることを特徴とする請求項 13～20 のいずれか記載の ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

22. GDP/GTP 交換因子が、Rac 特異的な GDP/GTP 交換因子であることを特徴とする請求項 13～21 のいずれか記載の ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

23. Rac 特異的な GDP/GTP 交換因子が Tiam1 であることを特徴とする請求項 22 記載の ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法。

15 24. 請求項 13～23 のいずれか記載の ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、GvH、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法。

25 25. 請求項 13～23 のいずれか記載の ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合に干渉する物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とする Rac を活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法。

26. DOCK2 と ELMO と GDP/GTP 交換因子と被検物質とを接触させ、次いで DOCK2 と ELMO との会合形成の程度、あるいは、ELMO と GDP/GTP 交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とする Rac 活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング

方法。

27. DOCK2のSH3ドメインとELMOとGDP/GTP交換因子と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2のSH3ドメインとELMOとの会合形成の程度、あるいは、ELMOとGDP/GTP交換因子との会合形成の程度を評価することを特徴とするRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

28. GTP結合型の活性型Racを検出することにより、会合形成の程度を評価することを特徴とする請求項26又は27記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

29. ELMOが、DOCK2と結合したELMOであることを特徴とする請求項26～28のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

30. ELMOが、ELMO1であることを特徴とする請求項26～29のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

31. GDP/GTP交換因子が、Rac特異的なGDP/GTP交換因子であることを特徴とする請求項26～30のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

32. Rac特異的なGDP/GTP交換因子がTiam1であることを特徴とする請求項31記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

33. 請求項26～32のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするリンパ球遊走制御機能の促進物質又は抑制物質の探索方法。

34. 請求項26～32のいずれか記載のRac活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とする

とするアレルギー、自己免疫疾患、G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬の探索方法。

35. 請求項26～32のいずれか記載のR a c活性化促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を利用することを特徴とするR a cを活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬の探索方法。

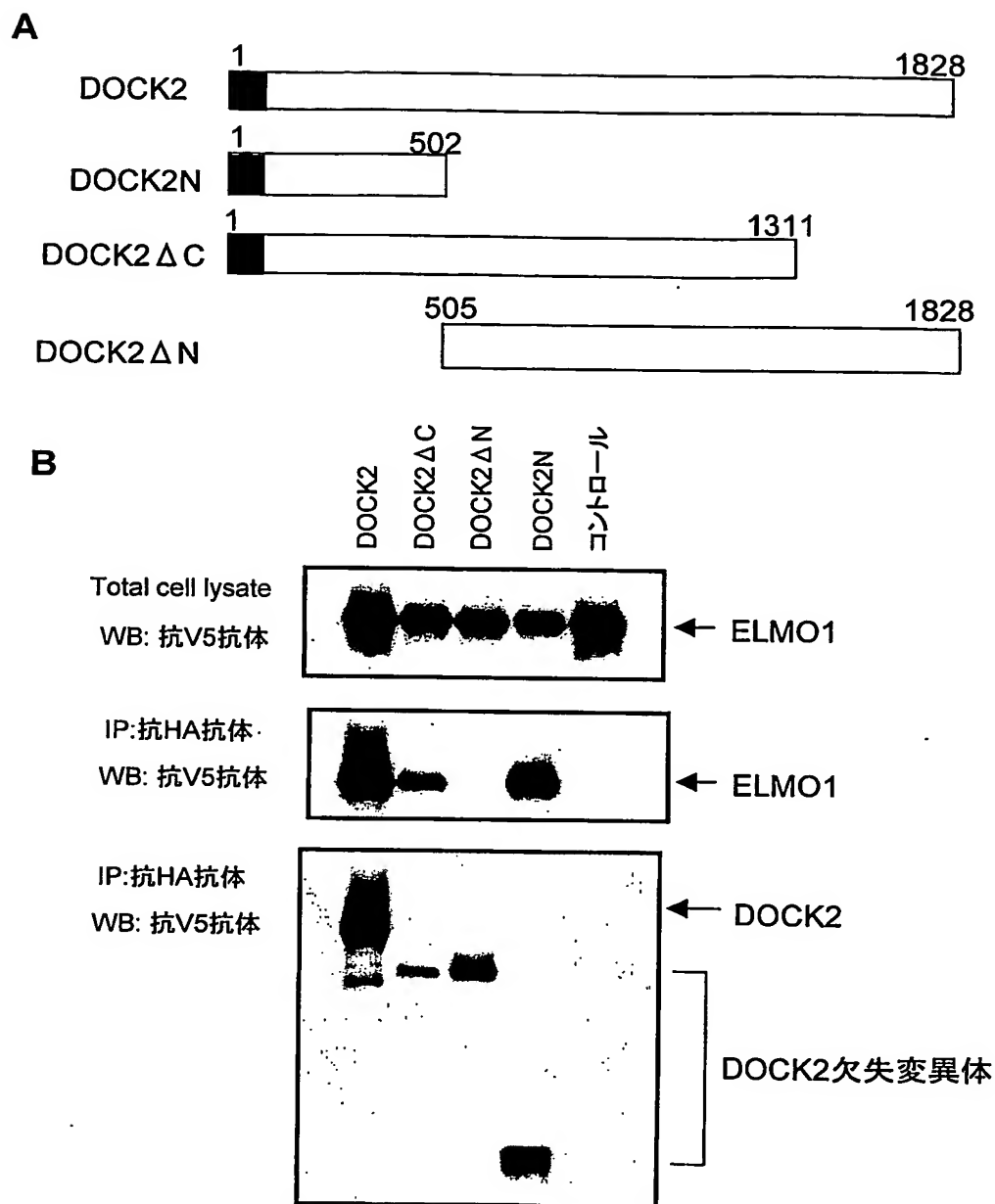
36. 請求項11、24又は34記載の探索方法により得られることを特徴とするアレルギー、自己免疫疾患、G v H、移植片拒絶等の免疫関連疾患に対する治療薬。

10 37. 請求項12、25又は35記載の探索方法により得られることを特徴とするR a cを活性化して細胞骨格の再構築を促進する、リンパ球遊走抑制に起因する疾病に対する治療薬。

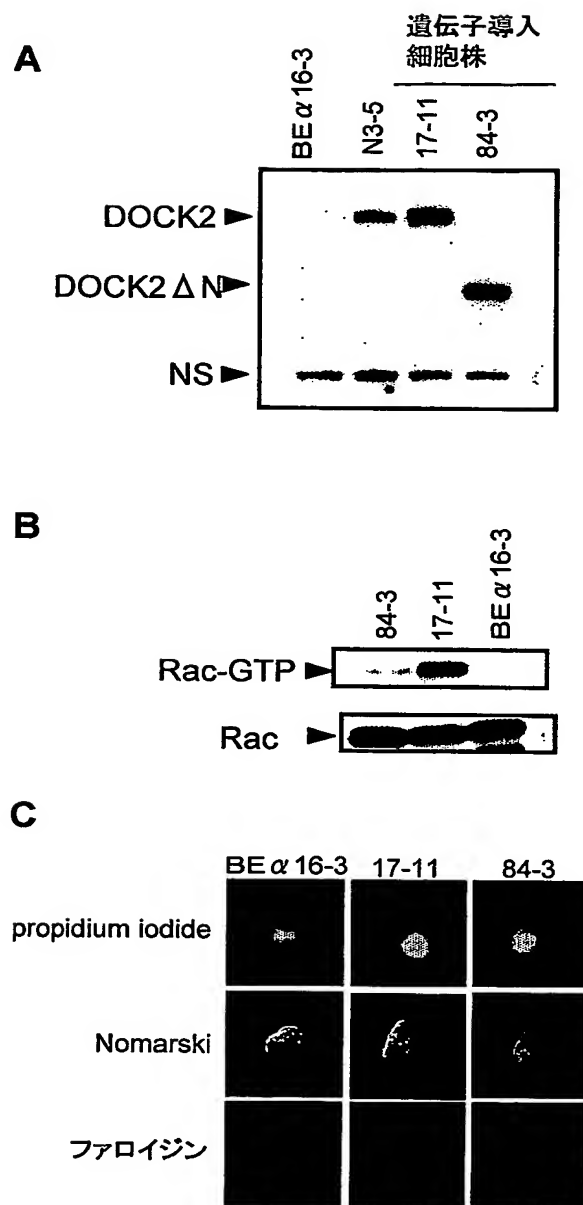
15 38. SH3ドメインを含むDOCK2のN末端領域を標的とし、DOCK2のSH3ドメインと該SH3ドメイン結合タンパク質と被検物質とを接触させ、次いでDOCK2とSH3ドメイン結合タンパク質との会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2機能阻害物質のスクリーニング方法。

20 39. 完全長DOCK2及びDOCK2欠失変異体を発現する遺伝子導入細胞株を用い、これらの細胞株におけるR a c活性化の程度を測定・評価し、DOCK2の機能ドメインを同定し、該機能ドメインと会合する機能ドメイン会合分子を探索し、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子と被検物質とを接触させ、DOCK2の機能ドメインと機能ドメイン会合分子との会合形成の程度を評価することを特徴とするDOCK2機能阻害物質のスクリーニング方法。

第1図



## 第2図

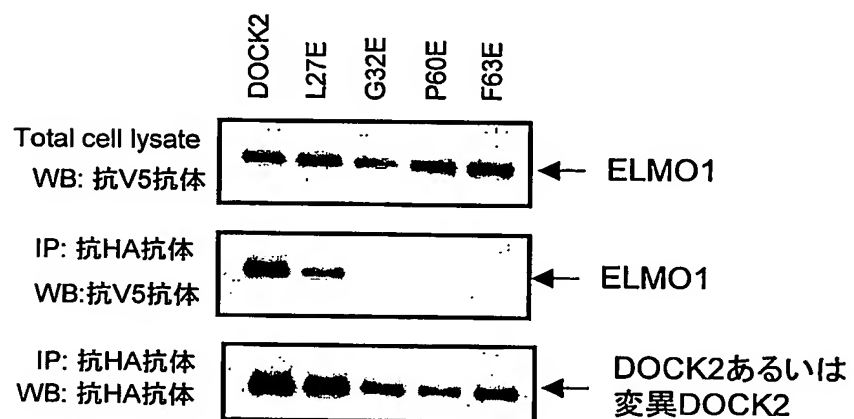


## 第3図

A

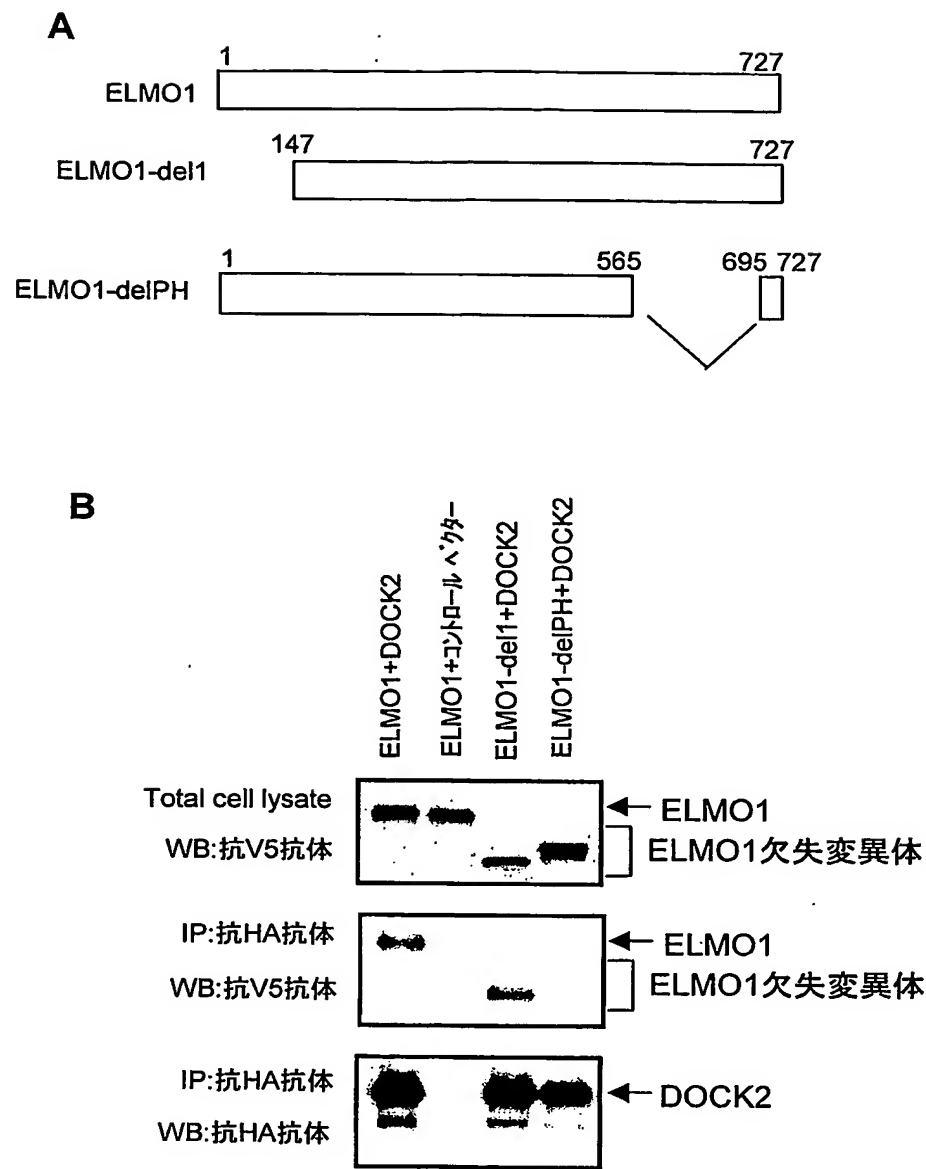
10                      20                      30                      40  
 ERHGVAFYNF~~GG~~SEAQH~~LT~~LQIGD~~V~~VRIQETGGDWYRGYL  
 50                      60                      70                      80  
 IKHKLSQGIF~~PT~~SFIHLKEVTVEKRRNIENIIPAEIPLAQ

B

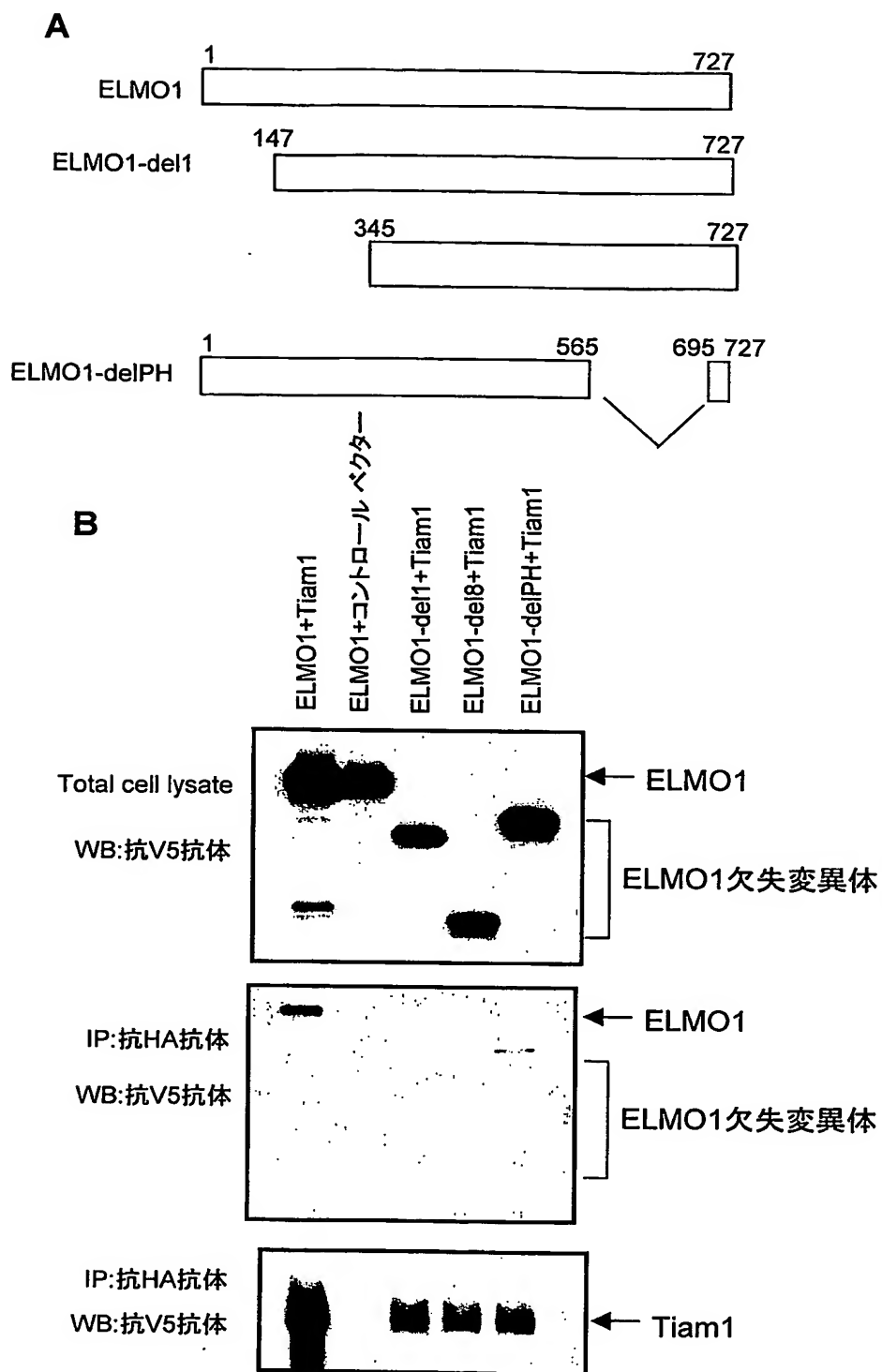




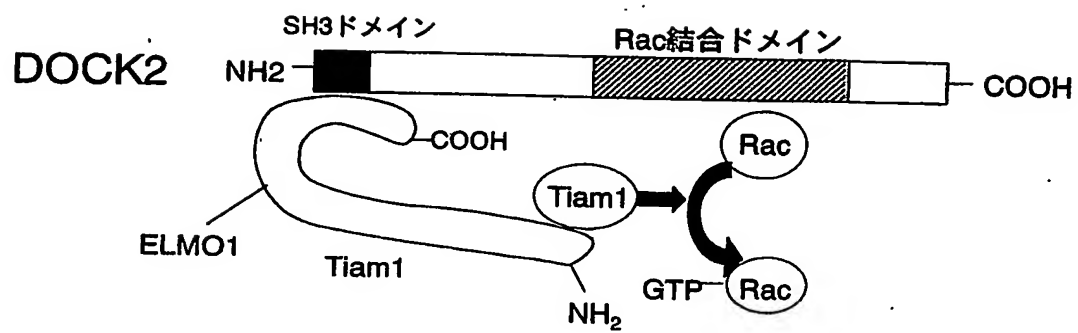
第 4 図



## 第5図



第6図



## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> The functional domain and its associated molecule of DOCK2 which is essential for lymphocyte migration

<130> A031-44PCT

<140>

<141>

<150> JP P2002-342683

<151> 2002-11-26

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1828

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Ala Pro Trp Arg Lys Thr Asp Lys Glu Arg His Gly Val Ala Ile

1

5

10

15

Tyr Asn Phe Gln Gly Ser Glu Ala Gln His Leu Thr Leu Gln Ile Gly

20

25

30

Asp Val Val Arg Ile Gln Glu Thr Cys Gly Asp Trp Tyr Arg Gly Tyr

35

40

45

Leu Ile Lys His Lys Leu Ser Gln Gly Ile Phe Pro Thr Ser Phe Ile

50

55

60

His Leu Lys Glu Val Thr Val Glu Lys Arg Arg Asn Ile Glu Asn Ile

65

70

75

80

Ile Pro Ala Glu Ile Pro Leu Ala Gln Glu Val Thr Thr Thr Leu Trp

85

90

95

Glu Trp Gly Ser Ile Trp Lys Gln Leu Tyr Val Ala Ser Lys Lys Glu

100

105

110

Arg Phe Leu Gln Val Gln Ser Met Met Tyr Asp Leu Met Glu Trp Arg

115

120

125

Ser Gln Leu Leu Ser Gly Thr Leu Pro Lys Asp Glu Leu Lys Glu Leu

130

135

140

Lys Gln Lys Val Thr Ser Lys Ile Asp Tyr Gly Asn Lys Ile Leu Glu

145

150

155

160

Leu Asp Leu Ile Val Arg Asp Glu Asp Gly Asn Ile Leu Asp Pro Asp

165

170

175

Lys Thr Ser Val Ile Ser Leu Phe His Ala His Glu Glu Ala Thr Tyr

180

185

190

Lys Ile Thr Glu Arg Ile Lys Glu Glu Met Ser Lys Asp Gln Pro Asp

195

200

205

Tyr Gly Val Tyr Ser Arg Ile Ser Ser Ser Pro Thr His Ser Leu Tyr

210

215

220

Val Phe Val Arg Asn Phe Val Cys Arg Ile Gly Glu Asp Ala Glu Leu

225

230

235

240

Phe Met Ser Leu Tyr Asp Pro His Lys Gln Thr Val Ile Ser Glu Asn

245

250

255

Tyr Leu Val Arg Trp Gly Ser Lys Gly Phe Pro Lys Glu Ile Glu Met

260

265

270

Leu Asn Asn Leu Lys Val Val Phe Thr Asp Leu Gly Asn Lys Asp Leu

275

280

285

Asn Arg Asp Lys Ile Phe Leu Ile Cys Gln Ile Val Arg Ile Gly Lys

290

295

300

Met Asp Leu Lys Asp Ile Asn Ala Lys Lys Cys Thr Gln Gly Leu Arg  
305 310 315 320

Arg Pro Phe Gly Val Ala Val Met Asp Ile Thr Asp Ile Ile Lys Gly  
325 330 335

Lys Ala Glu Ser Asp Glu Glu Lys Gln His Phe Ile Pro Phe His Pro  
340 345 350

Val Ser Ala Glu Asn Asp Phe Leu His Ser Leu Leu Gly Lys Val Ile  
355 360 365

Ala Ser Lys Gly Asp Ser Gly Gly Gln Gly Leu Trp Val Thr Met Lys  
370 375 380

Met Leu Val Gly Asp Ile Ile Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Pro His Leu  
385 390 395 400

Val Asp Arg Thr Thr Val Val Ala Arg Lys Leu Gly Phe Pro Glu Ile  
405 410 415

Ile Met Pro Gly Asp Val Arg Asn Asp Ile Tyr Ile Thr Leu Leu Gln  
420 425 430

Gly Asp Phe Asp Lys Tyr Thr Lys Thr Thr Gln Arg Asn Val Glu Val  
435 440 445

Ile Met Cys Val Cys Thr Glu Asp Gly Lys Val Leu Pro Asn Ala Ile

450 455 460

Cys Val Gly Ala Gly Asp Lys Ala Met Asn Glu Tyr His Ser Val Val

465 470 475 480

Tyr Tyr Gln Val Lys Gln Pro Arg Trp Met Glu Thr Val Lys Val Ala

485 490 495

Val Pro Ile Glu Asp Met Gln Arg Ile His Leu Arg Phe Met Phe Arg

500 505 510

His Arg Ser Ser Leu Glu Ser Lys Asp Lys Gly Glu Lys Asn Phe Ala

515 520 525

Met Ser Tyr Val Lys Leu Met Lys Glu Asp Gly Thr Thr Leu His Asp

530 535 540

Gly Tyr His Glu Leu Val Val Leu Lys Gly Asp Ser Lys Lys Met Glu

545 550 555 560

Asp Ala Ser Ala Tyr Leu Thr Leu Pro Ser Tyr Arg His Pro Val Glu

565 570 575

Asn Lys Gly Ala Thr Leu Ser Arg Ser Ser Ser Ser Val Gly Gly Leu

580 585 590



Ser Val Ser Ser Arg Asp Val Phe Ser Ile Ser Thr Leu Val Cys Ser

595

600

605

Thr Lys Leu Thr Gln Asn Val Gly Leu Leu Gly Leu Leu Lys Trp Arg

610

615

620

Met Lys Pro Gln Leu Leu Gln Glu Asn Leu Glu Lys Leu Lys Ile Val

625

630

635

640

Asp Gly Glu Glu Val Val Lys Phe Leu Gln Asp Thr Leu Asp Ala Leu

645

650

655

Phe Asn Ile Met Met Glu His Ser Gln Ser Asn Glu Tyr Asp Ile Leu

660

665

670

Val Phe Asp Ala Leu Ile Tyr Ile Ile Gly Leu Ile Ala Asp Arg Lys

675

680

685

Phe Gln His Phe Asn Thr Val Leu Glu Ala Tyr Ile Gln Gln His Phe

690

695

700

Ser Ala Thr Leu Ala Tyr Lys Lys Leu Met Thr Val Leu Lys Thr Tyr

705

710

715

720

Leu Asp Thr Ser Ser Arg Gly Glu Gln Cys Glu Pro Ile Leu Arg Thr

725

730

735

Leu Lys Ala Leu Glu Tyr Val Phe Lys Phe Ile Val Arg Ser Arg Thr

740

745

750

Leu Phe Ser Gln Leu Tyr Glu Gly Lys Glu Gln Met Glu Phe Glu Glu

755

760

765

Ser Met Arg Arg Leu Phe Glu Ser Ile Asn Asn Leu Met Lys Ser Gln

770

775

780

Tyr Lys Thr Thr Ile Leu Leu Gln Val Ala Ala Leu Lys Tyr Ile Pro

785

790

795

800

Ser Val Leu His Asp Val Glu Thr Val Phe Asp Ala Lys Leu Leu Ser

805

810

815

Gln Leu Leu Tyr Glu Phe Tyr Thr Cys Ile Pro Pro Val Lys Leu Gln

820

825

830

Lys Gln Lys Val Gln Ser Met Asn Glu Ile Val Gln Ser Asn Leu Phe

835

840

845

Lys Lys Gln Glu Cys Arg Asp Ile Leu Leu Pro Val Ile Thr Lys Glu

850

855

860

Leu Lys Glu Leu Leu Glu Gln Arg Asp Asp Gly Gln His Gln Ala Glu

865

870

875

880

Lys Lys His Cys Val Glu Leu Leu Asn Ser Ile Leu Glu Val Leu Ser  
885 890 895

Cys Gln Asp Ala Ala Phe Thr Tyr Asp His Ile Gln Glu Ile Met Val  
900 905 910

Gln Leu Leu Arg Thr Val Asn Arg Thr Val Ile Thr Met Gly Arg Asp  
915 920 925

His Ala Leu Ile Ser His Phe Glu Ala Cys Met Thr Ala Ile Leu Asp  
930 935 940

Gln Met Gly Asp Gln His Tyr Ser Phe Tyr Ile Glu Thr Phe Gln Thr  
945 950 955 960

Ser Ser Asp Leu Val Asp Phe Leu Met Glu Thr Phe Ile Met Phe Lys  
965 970 975

Asp Leu Ile Gly Lys Asn Val Tyr Pro Gly Asp Trp Met Ala Met Ser  
980 985 990

Met Val Gln Asn Arg Val Phe Leu Arg Ala Ile Asn Lys Phe Ala Glu  
995 1000 1005

Thr Met Asn Gln Lys Phe Leu Glu His Thr Ser Phe Glu Phe Gln Leu  
1010 1015 1020

Trp Asn Asn Tyr Phe His Leu Ala Val Ala Phe Ile Thr Gln Asp Ser

1025                      1030                      1035                      1040

Leu Gln Leu Glu Gln Phe Thr His Ala Lys Tyr Asn Lys Ile Leu Asn

1045                      1050                      1055

Lys Tyr Gly Asp Met Arg Arg Leu Ile Gly Phe Ser Ile Arg Asp Met

1060                      1065                      1070

Trp Tyr Lys Leu Gly Gln Asn Lys Ile Cys Phe Ile Pro Gly Met Val

1075                      1080                      1085

Gly Pro Ile Leu Glu Met Thr Leu Ile Pro Glu Ala Glu Leu Arg Lys

1090                      1095                      1100

Ala Thr Ile Pro Ile Phe Phe Asp Met Met Leu Cys Glu Tyr Gln Arg

1105                      1110                      1115                      1120

Thr Gly Ala Phe Lys Lys Phe Glu Asn Glu Ile Ile Leu Lys Leu Asp

1125                      1130                      1135

His Glu Val Glu Gly Gly Arg Gly Asp Glu Gln Tyr Met Gln Leu Leu

1140                      1145                      1150

Glu Ser Ile Leu Met Glu Cys Thr Ala Glu His Pro Thr Ile Ala Lys

1155                      1160                      1165

Ser Val Glu Asn Phe Val Ser Leu Val Lys Gly Leu Leu Glu Lys Leu

1170

1175

1180

Leu Asp Tyr Arg Gly Val Met Thr Asp Glu Ser Lys Asp Asn Arg Met

1185

1190

1195

1200

Ser Cys Thr Val Asn Leu Leu Asn Phe Tyr Lys Asp Asn Asn Arg Glu

1205

1210

1215

Glu Met Tyr Ile Arg Tyr Leu Tyr Lys Leu Arg Asp Leu His Leu Asp

1220

1225

1230

Cys Glu Asn Tyr Thr Glu Ala Ala Tyr Thr Leu Leu Leu His Thr Trp

1235

1240

1245

Leu Leu Lys Trp Ser Asp Glu Gln Cys Ala Ser Gln Val Met Gln Thr

1250

1255

1260

Gly Gln Gln His Pro Gln Thr His Arg Gln Leu Lys Glu Thr Leu Tyr

1265

1270

1275

1280

Glu Thr Ile Ile Gly Tyr Phe Asp Lys Gly Lys Met Trp Glu Glu Ala

1285

1290

1295

Ile Ser Leu Cys Lys Glu Leu Ala Glu Gln Tyr Glu Met Glu Ile Phe

1300

1305

1310

Asp Tyr Glu Leu Leu Ser Gln Asn Leu Thr Gln Gln Ala Lys Phe Tyr

1315

1320

1325

Glu Asn Ile Met Lys Ile Leu Arg Thr Lys Pro Asp Tyr Phe Ala Val

1330

1335

1340

Gly Tyr Tyr Gly Gln Gly Phe Pro Ser Phe Leu Arg Asn Lys Val Phe

1345

1350

1355

1360

Ile Tyr Arg Gly Lys Glu Tyr Glu Arg Arg Glu Asp Phe Gln Met Gln

1365

1370

1375

Leu Leu Ser Gln Phe Pro Asn Ala Glu Lys Met Asn Thr Thr Ser Ala

1380

1385

1390

Pro Gly Asp Asp Val Arg Asn Ala Pro Gly Gln Tyr Ile Gln Cys Phe

1395

1400

1405

Thr Val Gln Pro Val Leu Asp Glu His Pro Arg Phe Lys Asn Lys Pro

1410

1415

1420

Val Pro Asp Gln Ile Ile Asn Phe Tyr Lys Ser Asn Tyr Val Gln Lys

1425

1430

1435

1440

Phe His Tyr Ser Arg Pro Val Arg Arg Gly Lys Val Asp Pro Glu Asn

1445

1450

1455

Glu Phe Ala Ser Met Trp Ile Glu Arg Thr Ser Phe Leu Thr Ala Tyr

1460

1465

1470

Lys Leu Pro Gly Ile Leu Arg Trp Phe Glu Val Val His Met Ser Gln

1475

1480

1485

Thr Thr Ile Ser Pro Leu Glu Asn Ala Ile Glu Thr Met Ser Thr Val

1490

1495

1500

Asn Glu Lys Ile Leu Met Met Ile Asn Gln Tyr Gln Ser Asp Glu Ser

1505

1510

1515

1520

Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser Met Leu Leu Asn Gly Ile Val Asp Pro

1525

1530

1535

Ala Val Met Gly Gly Phe Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Phe Phe Thr Glu

1540

1545

1550

Glu Tyr Ser Arg Glu His Pro Glu Asp Gln Asp Lys Leu Ser His Leu

1555

1560

1565

Lys Asp Leu Ile Ala Trp Gln Ile Pro Phe Leu Gly Ala Gly Ile Lys

1570

1575

1580

Ile His Glu Lys Arg Val Ser Asp Asn Leu Arg Pro Phe His Asp Arg

1585

1590

1595

1600

Met Glu Glu Cys Phe Lys Asn Leu Lys Met Lys Val Glu Lys Glu Tyr

1605

1610

1615

Gly Val Arg Glu Met Pro Asp Phe Glu Asp Arg Arg Val Gly Arg Pro

1620

1625

1630

Arg Ser Met Leu Arg Ser Tyr Arg Gln Met Ser Val Ile Ser Leu Ala

1635

1640

1645

Ser Met His Ser Asp Cys Ser Thr Pro Ser Lys Val Pro Ala Glu Ser

1650

1655

1660

Phe Asp Leu Glu Ser Ala Pro Pro Lys Thr Pro Lys Val Glu Glu Glu

1665

1670

1675

1680

Pro Ile Ser Pro Gly Ser Thr Leu Pro Glu Val Lys Leu Arg Arg Ser

1685

1690

1695

Lys Lys Arg Thr Lys Arg Ser Ser Val Val Phe Ala Asp Glu Lys Ala

1700

1705

1710

Ala Thr Glu Ser Asp Leu Lys Arg Leu Ser Arg Lys Gln Glu Phe Met

1715

1720

1725

Ser Asp Thr Asn Leu Ser Glu His Ala Ala Ile Pro Ala Arg Val Ser

1730

1735

1740



Ile Leu Ser Gln Met Ser Phe Ala Ser Gln Ser Met Pro Thr Ile Pro  
1745 1750 1755 1760

Ala Leu Thr Leu Ser Val Ala Gly Val Pro Gly Leu Asp Glu Ala Asn  
1765 1770 1775

Thr Ser Pro Arg Leu Ser Gln Thr Phe Phe Gln Val Ser Asp Gly Asp  
1780 1785 1790

Lys Lys Thr Leu Lys Lys Lys Lys Val Asn Gln Phe Phe Lys Thr Met  
1795 1800 1805

Leu Ala Ser Lys Ser Ser Glu Glu Ser Lys Gln Ile Pro Asp Phe Leu  
1810 1815 1820

Ser Thr Asn Met  
1825

<210> 2

<211> 1830

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Pro Trp Arg Lys Ala Asp Lys Glu Arg His Gly Val Ala Ile

1                      5                      10                      15

Tyr Asn Phe Gln Gly Ser Gly Ala Pro Gln Leu Ser Leu Gln Ile Gly

20                      25                      30

Asp Val Val Arg Ile Gln Glu Thr Cys Gly Asp Trp Tyr Arg Gly Tyr

35                      40                      45

Leu Ile Lys His Lys Met Leu Gln Gly Ile Phe Pro Lys Ser Phe Ile

50                      55                      60

His Ile Lys Glu Val Thr Val Glu Lys Arg Arg Asn Thr Glu Asn Ile

65                      70                      75                      80

Ile Pro Ala Glu Ile Pro Leu Ala Gln Glu Val Thr Thr Thr Leu Trp

85                      90                      95

Glu Trp Gly Ser Ile Trp Lys Gln Leu Tyr Val Ala Ser Lys Lys Glu

100                      105                      110

Arg Phe Leu Gln Val Gln Ser Met Met Tyr Asp Leu Met Glu Trp Arg

115                      120                      125

Ser Gln Leu Leu Ser Gly Thr Leu Pro Lys Asp Glu Leu Lys Glu Leu

130                      135                      140

Lys Gln Lys Val Thr Ser Lys Ile Asp Tyr Gly Asn Lys Ile Leu Glu

145                      150                      155                      160

Leu Asp Leu Ile Val Arg Asp Glu Asp Gly Asn Ile Leu Asp Pro Asp

165                      170                      175

Asn Thr Ser Val Ile Ser Leu Phe His Ala His Glu Glu Ala Thr Asp

180                      185                      190

Lys Ile Thr Glu Arg Ile Lys Glu Glu Met Ser Lys Asp Gln Pro Asp

195                      200                      205

Tyr Ala Met Tyr Ser Arg Ile Ser Ser Ser Pro Thr His Ser Leu Tyr

210                      215                      220

Val Phe Val Arg Asn Phe Val Cys Arg Ile Gly Glu Asp Ala Glu Leu

225                      230                      235                      240

Phe Met Ser Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Gln Thr Val Ile Ser Glu Asn

245                      250                      255

Tyr Leu Val Arg Trp Gly Ser Arg Gly Phe Pro Lys Glu Ile Glu Met

260                      265                      270

Leu Asn Asn Leu Lys Val Val Phe Thr Asp Leu Gly Asn Lys Asp Leu

275                      280                      285

Asn Arg Asp Lys Ile Tyr Leu Ile Cys Gln Ile Val Arg Val Gly Lys

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 290   | 295 | 300 |     |
| Met Asp Leu Lys Asp Thr Gly Ala Lys Lys Cys Thr Gln Gly Leu Arg |     |     |     |
| 305   | 310 | 315 | 320 |
| Arg Pro Phe Gly Val Ala Val Met Asp Ile Thr Asp Ile Ile Lys Gly |     |     |     |
|   | 325 | 330 | 335 |
| Lys Ala Glu Ser Asp Glu Glu Lys Gln His Phe Ile Pro Phe His Pro |     |     |     |
|   | 340 | 345 | 350 |
| Val Thr Ala Glu Asn Asp Phe Leu His Ser Leu Leu Gly Lys Val Ile |     |     |     |
|   | 355 | 360 | 365 |
| Ala Ser Lys Gly Asp Ser Gly Gly Gln Gly Leu Trp Val Thr Met Lys |     |     |     |
|   | 370 | 375 | 380 |
| Met Leu Val Gly Asp Ile Ile Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Pro His Leu |     |     |     |
| 385   | 390 | 395 | 400 |
| Val Asp Arg Thr Thr Val Val Ala Arg Lys Leu Gly Phe Pro Glu Ile |     |     |     |
|   | 405 | 410 | 415 |
| Ile Met Pro Gly Asp Val Arg Asn Asp Ile Tyr Ile Thr Leu Leu Gln |     |     |     |
|   | 420 | 425 | 430 |
| Gly Asp Phe Asp Lys Tyr Asn Lys Thr Thr Gln Arg Asn Val Glu Val |     |     |     |

|   |     |             |
|---|-----|-------------|
| 435   | 440 | 445         |
| Ile Met Cys Val Cys Ala Glu Asp Gly Lys Thr Leu Pro Asn Ala Ile |     |             |
| 450   | 455 | 460         |
| Cys Val Gly Ala Gly Asp Lys Pro Met Asn Glu Tyr Arg Ser Val Val |     |             |
| 465   | 470 | 475 480     |
| Tyr Tyr Gln Val Lys Gln Pro Arg Trp Met Glu Thr Val Lys Val Ala |     |             |
|   | 485 | 490 495     |
| Val Pro Ile Glu Asp Met Gln Arg Ile His Leu Arg Phe Met Phe Arg |     |             |
|   | 500 | 505 510     |
| His Arg Ser Ser Leu Glu Ser Lys Asp Lys Gly Glu Lys Asn Phe Ala |     |             |
|   | 515 | 520 525     |
| Met Ser Tyr Val Lys Leu Met Lys Glu Asp Gly Thr Thr Leu His Asp |     |             |
|   | 530 | 535 540     |
| Gly Phe His Asp Leu Val Val Leu Lys Gly Asp Ser Lys Lys Met Glu |     |             |
|   | 545 | 550 555 560 |
| Asp Ala Ser Ala Tyr Leu Thr Leu Pro Ser Tyr Arg His His Val Glu |     |             |
|   | 565 | 570 575     |
| Asn Lys Gly Ala Thr Leu Ser Arg Ser Ser Ser Ser Val Gly Gly Leu |     |             |

580 585 590

Ser Val Ser Ser Arg Asp Val Phe Ser Ile Ser Thr Leu Val Cys Ser

595 600 605

Thr Lys Leu Thr Gln Asn Val Gly Leu Leu Gly Leu Leu Lys Trp Arg

610 615 620

Met Lys Pro Gln Leu Leu Gln Glu Asn Leu Glu Lys Leu Lys Ile Val

625 630 635 640

Asp Gly Glu Glu Val Val Lys Phe Leu Gln Asp Thr Leu Asp Ala Leu

645 650 655

Phe Asn Ile Met Met Glu His Ser Gln Ser Asp Glu Tyr Asp Ile Leu

660 665 670

Val Phe Asp Ala Leu Ile Tyr Ile Ile Gly Leu Ile Ala Asp Arg Lys

675 680 685

Phe Gln His Phe Asn Thr Val Leu Glu Ala Tyr Ile Gln Gln His Phe

690 695 700

Ser Ala Thr Leu Ala Tyr Lys Lys Leu Met Thr Val Leu Lys Thr Tyr

705 710 715 720

Leu Asp Thr Ser Ser Arg Gly Glu Gln Cys Glu Pro Ile Leu Arg Thr

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 725   | 730 | 735 |
| Leu Lys Ala Leu Glu Tyr Val Phe Lys Phe Ile Val Arg Ser Arg Thr |     |     |
| 740   | 745 | 750 |
| Leu Phe Ser Gln Leu Tyr Glu Gly Lys Glu Gln Met Glu Phe Glu Glu |     |     |
| 755   | 760 | 765 |
| Ser Met Arg Arg Leu Phe Glu Ser Ile Asn Asn Leu Met Lys Ser Gln |     |     |
| 770   | 775 | 780 |
| Tyr Lys Thr Thr Ile Leu Leu Gln Val Ala Ala Leu Lys Tyr Ile Pro |     |     |
| 785   | 790 | 795 |
|   |     | 800 |
| Ser Val Leu His Asp Val Glu Met Val Phe Asp Ala Lys Leu Leu Ser |     |     |
| 805   | 810 | 815 |
| Gln Leu Leu Tyr Glu Phe Tyr Thr Cys Ile Pro Pro Val Lys Leu Gln |     |     |
| 820   | 825 | 830 |
| Lys Gln Lys Val Gln Ser Met Asn Glu Ile Val Gln Ser Asn Leu Phe |     |     |
| 835   | 840 | 845 |
| Lys Lys Gln Glu Cys Arg Asp Ile Leu Leu Pro Val Ile Thr Lys Glu |     |     |
| 850   | 855 | 860 |
| Leu Lys Glu Leu Leu Glu Gln Lys Asp Asp Met Gln His Gln Val Leu |     |     |

865                      870                      875                      880

Glu Arg Lys Tyr Cys Val Glu Leu Leu Asn Ser Ile Leu Glu Val Leu

                    885                      890                      895

Ser Tyr Gln Asp Ala Ala Phe Thr Tyr His His Ile Gln Glu Ile Met

                    900                      905                      910

Val Gln Leu Leu Arg Thr Val Asn Arg Thr Val Ile Thr Met Gly Arg

                    915                      920                      925

Asp His Ile Leu Ile Ser His Phe Val Ala Cys Met Thr Ala Ile Leu

                    930                      935                      940

Asn Gln Met Gly Asp Gln His Tyr Ser Phe Tyr Ile Glu Thr Phe Gln

945                      950                      955                      960

Thr Ser Ser Glu Leu Val Asp Phe Leu Met Glu Thr Phe Ile Met Phe

                    965                      970                      975

Lys Asp Leu Ile Gly Lys Asn Val Tyr Pro Gly Asp Trp Met Ala Met

                    980                      985                      990

Ser Met Val Gln Asn Arg Val Phe Leu Arg Ala Ile Asn Lys Phe Ala

                    995                      1000                      1005

Glu Thr Met Asn Gln Lys Phe Leu Glu His Thr Asn Phe Glu Phe Gln



|   |      |      |      |
|---|------|------|------|
| 1010  | 1015 | 1020 |      |
| Leu Trp Asn Asn Tyr Phe His Leu Ala Val Ala Phe Ile Thr Gln Asp |      |      |      |
| 1025  | 1030 | 1035 | 1040 |
| Ser Leu Gln Leu Glu Gln Phe Ser His Ala Lys Tyr Asn Lys Ile Leu |      |      |      |
| 1045  | 1050 | 1055 |      |
| Asn Lys Tyr Gly Asp Met Arg Arg Leu Ile Gly Phe Ser Ile Arg Asp |      |      |      |
| 1060  | 1065 | 1070 |      |
| Met Trp Tyr Lys Leu Gly Gln Asn Lys Ile Cys Phe Ile Pro Gly Met |      |      |      |
| 1075  | 1080 | 1085 |      |
| Val Gly Pro Ile Leu Glu Met Thr Leu Ile Pro Glu Ala Glu Leu Arg |      |      |      |
| 1090  | 1095 | 1100 |      |
| Lys Ala Thr Ile Pro Ile Phe Phe Asp Met Met Leu Cys Glu Tyr Gln |      |      |      |
| 1105  | 1110 | 1115 | 1120 |
| Arg Ser Gly Asp Phe Lys Lys Phe Glu Asn Glu Ile Ile Leu Lys Leu |      |      |      |
| 1125  | 1130 | 1135 |      |
| Asp His Glu Val Glu Gly Gly Arg Gly Asp Glu Gln Tyr Met Gln Leu |      |      |      |
| 1140  | 1145 | 1150 |      |
| Leu Glu Ser Ile Leu Met Glu Cys Ala Ala Glu His Pro Thr Ile Ala |      |      |      |

|   |      |      |      |
|---|------|------|------|
| 1155  | 1160 | 1165 |      |
| Lys Ser Val Glu Asn Phe Val Asn Leu Val Lys Gly Leu Leu Glu Lys |      |      |      |
| 1170  | 1175 | 1180 |      |
| Leu Leu Asp Tyr Arg Gly Val Met Thr Asp Glu Ser Lys Asp Asn Arg |      |      |      |
| 1185  | 1190 | 1195 | 1200 |
| Met Ser Cys Thr Val Asn Leu Leu Asn Phe Tyr Lys Asp Asn Asn Arg |      |      |      |
| 1205  | 1210 | 1215 |      |
| Glu Glu Met Tyr Ile Arg Tyr Leu Tyr Lys Leu Arg Asp Leu His Leu |      |      |      |
| 1220  | 1225 | 1230 |      |
| Asp Cys Asp Asn Tyr Thr Glu Ala Ala Tyr Thr Leu Leu Leu His Thr |      |      |      |
| 1235  | 1240 | 1245 |      |
| Trp Leu Leu Lys Trp Ser Asp Glu Gln Cys Ala Ser Gln Val Met Gln |      |      |      |
| 1250  | 1255 | 1260 |      |
| Thr Gly Gln Gln His Pro Gln Thr His Arg Gln Leu Lys Glu Thr Leu |      |      |      |
| 1265  | 1270 | 1275 | 1280 |
| Tyr Glu Thr Ile Ile Gly Tyr Phe Asp Lys Gly Lys Met Trp Glu Glu |      |      |      |
| 1285  | 1290 | 1295 |      |
| Ala Ile Ser Leu Cys Lys Glu Leu Ala Glu Gln Tyr Glu Met Glu Ile |      |      |      |

|   |      |      |      |
|---|------|------|------|
| 1300  | 1305 | 1310 |      |
| Phe Asp Tyr Glu Leu Leu Ser Gln Asn Leu Ile Gln Gln Ala Lys Phe |      |      |      |
| 1315  | 1320 | 1325 |      |
| Tyr Glu Ser Ile Met Lys Ile Leu Arg Pro Lys Pro Asp Tyr Phe Ala |      |      |      |
| 1330  | 1335 | 1340 |      |
| Val Gly Tyr Tyr Gly Gln Gly Phe Pro Ser Phe Leu Arg Asn Lys Val |      |      |      |
| 1345  | 1350 | 1355 | 1360 |
| Phe Ile Tyr Arg Gly Lys Glu Tyr Glu Arg Arg Glu Asp Phe Gln Met |      |      |      |
| 1365  | 1370 | 1375 |      |
| Gln Leu Met Thr Gln Phe Pro Asn Ala Glu Lys Met Asn Thr Thr Ser |      |      |      |
| 1380  | 1385 | 1390 |      |
| Ala Pro Gly Asp Asp Val Lys Asn Ala Pro Gly Gln Tyr Ile Gln Cys |      |      |      |
| 1395  | 1400 | 1405 |      |
| Phe Thr Val Gln Pro Val Leu Asp Glu His Pro Arg Phe Lys Asn Lys |      |      |      |
| 1410  | 1415 | 1420 |      |
| Pro Val Pro Asp Gln Ile Ile Asn Phe Tyr Lys Ser Asn Tyr Val Gln |      |      |      |
| 1425  | 1430 | 1435 | 1440 |
| Arg Phe His Tyr Ser Arg Pro Val Arg Arg Gly Thr Val Asp Pro Glu |      |      |      |

|   |      |      |
|---|------|------|
| 1445  | 1450 | 1455 |
| Asn Glu Phe Ala Ser Met Trp Ile Glu Arg Thr Ser Phe Val Thr Ala |      |      |
| 1460  | 1465 | 1470 |
| Tyr Lys Leu Pro Gly Ile Leu Arg Trp Phe Glu Val Val His Met Ser |      |      |
| 1475  | 1480 | 1485 |
| Gln Thr Thr Ile Ser Pro Leu Glu Asn Ala Ile Glu Thr Met Ser Thr |      |      |
| 1490  | 1495 | 1500 |
| Ala Asn Glu Lys Ile Leu Met Met Ile Asn Gln Tyr Gln Ser Asp Glu |      |      |
| 1505  | 1510 | 1515 |
| Thr Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser Met Leu Leu Asn Gly Ile Val Asp |      |      |
| 1525  | 1530 | 1535 |
| Pro Ala Val Met Gly Gly Phe Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Phe Phe Thr |      |      |
| 1540  | 1545 | 1550 |
| Glu Glu Tyr Val Arg Asp His Pro Glu Asp Gln Asp Lys Leu Thr His |      |      |
| 1555  | 1560 | 1565 |
| Leu Lys Asp Leu Ile Ala Trp Gln Ile Pro Phe Leu Gly Ala Gly Ile |      |      |
| 1570  | 1575 | 1580 |
| Lys Ile His Glu Lys Arg Val Ser Asp Asn Leu Arg Pro Phe His Asp |      |      |

1585                      1590                      1595                      1600

Arg Met Glu Glu Cys Phe Lys Asn Leu Lys Met Lys Val Glu Lys Glu

1605                      1610                      1615

Tyr Gly Val Arg Glu Met Pro Asp Phe Asp Asp Arg Arg Val Gly Arg

1620                      1625                      1630

Pro Arg Ser Met Leu Arg Ser Tyr Arg Gln Met Ser Ile Ile Ser Leu

1635                      1640                      1645

Ala Ser Met Asn Ser Asp Cys Ser Thr Pro Ser Lys Pro Thr Ser Glu

1650                      1655                      1660

Ser Phe Asp Leu Glu Leu Ala Ser Pro Lys Thr Pro Arg Val Glu Gln

1665                      1670                      1675                      1680

Glu Glu Pro Ile Ser Pro Gly Ser Thr Leu Pro Glu Val Lys Leu Arg

1685                      1690                      1695

Arg Ser Lys Lys Arg Thr Lys Arg Ser Ser Val Val Phe Ala Asp Glu

1700                      1705                      1710

Lys Ala Ala Ala Glu Ser Asp Leu Lys Arg Leu Ser Arg Lys His Glu

1715                      1720                      1725

Phe Met Ser Asp Thr Asn Leu Ser Glu His Ala Ala Ile Pro Leu Lys

1730                      1735                      1740

Ala Ser Val Leu Ser Gln Met Ser Phe Ala Ser Gln Ser Met Pro Thr

1745                      1750                      1755                      1760

Ile Pro Ala Leu Ala Leu Ser Val Ala Gly Ile Pro Gly Leu Asp Glu

                    1765                      1770                      1775

Ala Asn Thr Ser Pro Arg Leu Ser Gln Thr Phe Leu Gln Leu Ser Asp

                    1780                      1785                      1790

Gly Asp Lys Lys Thr Leu Thr Arg Lys Lys Val Asn Gln Phe Phe Lys

                    1795                      1800                      1805

Thr Met Leu Ala Ser Lys Ser Ala Glu Glu Gly Lys Gln Ile Pro Asp

                    1810                      1815                      1820

Ser Leu Ser Thr Asp Leu

1825                      1830

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 727

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 3

Met Pro Pro Pro Ser Asp Ile Val Lys Val Ala Ile Glu Trp Pro Gly  
1 5 10 15

Ala Tyr Pro Lys Leu Met Glu Ile Asp Gln Lys Lys Pro Leu Ser Ala  
20 25 30

Ile Ile Lys Glu Val Cys Asp Gly Trp Ser Leu Ala Asn His Glu Tyr  
35 40 45

Phe Ala Leu Gln His Ala Asp Ser Ser Asn Phe Tyr Ile Thr Glu Lys  
50 55 60

Asn Arg Asn Glu Ile Lys Asn Gly Thr Ile Leu Arg Leu Thr Thr Ser  
65 70 75 80

Pro Ala Gln Asn Ala Gln Gln Leu His Glu Arg Ile Gln Ser Ser Ser  
85 90 95

Met Asp Ala Lys Leu Glu Ala Leu Lys Asp Leu Ala Ser Leu Ser Arg  
100 105 110

Asp Val Thr Phe Ala Gln Glu Phe Ile Asn Leu Asp Gly Ile Ser Leu  
115 120 125

Leu Thr Gln Met Val Glu Ser Gly Thr Glu Arg Tyr Gln Lys Leu Gln  
130 135 140

Lys Ile Met Lys Pro Cys Phe Gly Asp Met Leu Ser Phe Thr Leu Thr  
145 150 155 160

Ala Phe Val Glu Leu Met Asp His Gly Ile Val Ser Trp Asp Thr Phe  
165 170 175

Ser Val Ala Phe Ile Lys Lys Ile Ala Ser Phe Val Asn Lys Ser Ala  
180 185 190

Ile Asp Ile Ser Ile Leu Gln Arg Ser Leu Ala Ile Leu Glu Ser Met  
195 200 205

Val Leu Asn Ser His Asp Leu Tyr Gln Lys Val Ala Gln Glu Ile Thr  
210 215 220

Ile Gly Gln Leu Ile Pro His Leu Gln Gly Thr Asp Gln Glu Ile Gln  
225 230 235 240

Thr Tyr Thr Ile Ala Val Ile Asn Ala Leu Phe Leu Lys Ala Pro Asp  
245 250 255

Glu Arg Arg Gln Glu Met Ala Asn Ile Leu Ala Gln Lys Gln Leu Arg  
260 265 270

Tyr Ile Ile Leu Thr His Val Ile Arg Ala Gln Arg Ala Ile Asn Asn  
275 280 285



Glu Met Ala His Gln Leu Tyr Val Leu Gln Val Leu Thr Phe Asn Leu  
290 295 300

Leu Glu Asp Arg Met Met Thr Lys Met Asp Pro Gln Asp Gln Ala Gln  
305 310 315 320

Arg Asp Ile Ile Phe Glu Leu Arg Arg Ile Ala Phe Asp Ala Glu Ser  
325 330 335

Glu Pro Asn Asn Ser Ser Gly Ser Met Glu Lys Arg Lys Ser Met Tyr  
340 345 350

Thr Arg Asp Tyr Lys Lys Leu Gly Phe Ile Asn His Val Asn Pro Ala  
355 360 365

Met Asp Phe Thr Gln Thr Pro Pro Gly Met Leu Ala Leu Asp Asn Met  
370 375 380

Leu Tyr Phe Ala Lys His His Gln Asp Ala Tyr Ile Arg Ile Val Leu  
385 390 395 400

Glu Asn Ser Ser Arg Glu Asp Lys His Glu Cys Pro Phe Gly Arg Ser  
405 410 415

Ser Ile Glu Leu Thr Lys Met Leu Cys Glu Ile Leu Lys Val Gly Glu  
420 425 430

Leu Pro Ser Glu Thr Cys Asn Asp Phe His Pro Met Phe Phe Thr His  
435 440 445

Asp Arg Ser Phe Glu Glu Phe Phe Cys Ile Cys Ile Gln Leu Leu Asn  
450 455 460

Lys Thr Trp Lys Glu Met Arg Ala Thr Ser Glu Asp Phe Asn Lys Val  
465 470 475 480

Met Gln Val Val Lys Glu Gln Val Met Arg Ala Leu Thr Thr Lys Pro  
485 490 495

Ser Ser Leu Asp Gln Phe Lys Ser Lys Leu Gln Asn Leu Ser Tyr Thr  
500 505 510

Glu Ile Leu Lys Ile Arg Gln Ser Glu Arg Met Asn Gln Glu Asp Phe  
515 520 525

Gln Ser Arg Pro Ile Leu Glu Leu Lys Glu Lys Ile Gln Pro Glu Ile  
530 535 540

Leu Glu Leu Ile Lys Gln Gln Arg Leu Asn Arg Leu Val Glu Gly Thr  
545 550 555 560

Cys Phe Arg Lys Leu Asn Ala Arg Arg Arg Gln Asp Lys Phe Trp Tyr  
565 570 575

Cys Arg Leu Ser Pro Asn His Lys Val Leu His Tyr Gly Asp Leu Glu  
580 585 590

Glu Ser Pro Gln Gly Glu Val Pro His Asp Ser Leu Gln Asp Lys Leu  
595 600 605

Pro Val Ala Asp Ile Lys Ala Val Val Thr Gly Lys Asp Cys Pro His  
610 615 620

Met Lys Glu Lys Gly Ala Leu Lys Gln Asn Lys Glu Val Leu Glu Leu  
625 630 635 640

Ala Phe Ser Ile Leu Tyr Asp Ser Asn Cys Gln Leu Asn Phe Ile Ala  
645 650 655

Pro Asp Lys His Glu Tyr Cys Ile Trp Thr Asp Gly Leu Asn Ala Leu  
660 665 670

Leu Gly Lys Asp Met Met Ser Asp Leu Thr Arg Asn Asp Leu Asp Thr  
675 680 685

Leu Leu Ser Met Glu Ile Lys Leu Arg Leu Leu Asp Leu Glu Asn Ile  
690 695 700

Gln Ile Pro Asp Ala Pro Pro Pro Ile Pro Lys Glu Pro Ser Asn Tyr  
705 710 715 720

Asp Phe Val Tyr Asp Cys Asn

725

<210> 4

<211> 727

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Pro Pro Pro Ala Asp Ile Val Lys Val Ala Ile Glu Trp Pro Gly

1 5 10 15

Ala Tyr Pro Lys Leu Met Glu Ile Asp Gln Lys Lys Pro Leu Ser Ala

20 25 30

Ile Ile Lys Glu Val Cys Asp Gly Trp Ser Leu Ala Asn His Glu Tyr

35 40 45

Phe Ala Leu Gln His Ala Asp Ser Ser Asn Phe Tyr Ile Thr Glu Lys

50 55 60

Asn Arg Asn Glu Ile Lys Asn Gly Thr Ile Leu Arg Leu Thr Thr Ser

65 70 75 80

Pro Ala Gln Asn Ala Gln Gln Leu His Glu Arg Ile Gln Ser Ser Ser

85 90 95

Met Asp Ala Lys Leu Glu Ala Leu Lys Asp Leu Ala Ser Leu Ser Arg

100

105

110

Asp Val Thr Phe Ala Gln Glu Phe Ile Asn Leu Asp Gly Ile Ser Leu

115

120

125

Leu Thr Gln Met Val Glu Ser Gly Thr Glu Arg Tyr Gln Lys Leu Gln

130

135

140

Lys Ile Met Lys Pro Cys Phe Gly Asp Met Leu Ser Phe Thr Leu Thr

145

150

155

160

Ala Phe Val Glu Leu Met Asp His Gly Ile Val Ser Trp Asp Thr Phe

165

170

175

Ser Val Ala Phe Ile Lys Lys Ile Ala Ser Phe Val Asn Lys Ser Ala

180

185

190

Ile Asp Ile Ser Ile Leu Gln Arg Ser Leu Ala Ile Leu Glu Ser Met

195

200

205

Val Leu Asn Ser His Asp Leu Tyr Gln Lys Val Ala Gln Glu Ile Thr

210

215

220

Ile Gly Gln Leu Ile Pro His Leu Gln Gly Ser Asp Gln Glu Ile Gln

225

230

235

240

Thr Tyr Thr Ile Ala Val Ile Asn Ala Leu Phe Leu Lys Ala Pro Asp  
245 250 255

Glu Arg Arg Gln Glu Met Ala Asn Ile Leu Ala Gln Lys Gln Leu Arg  
260 265 270

Ser Ile Ile Leu Thr His Val Ile Arg Ala Gln Arg Ala Ile Asn Asn  
275 280 285

Glu Met Ala His Gln Leu Tyr Val Leu Gln Val Leu Thr Phe Asn Leu  
290 295 300

Leu Glu Asp Arg Met Met Thr Lys Met Asp Pro Gln Asp Gln Ala Gln  
305 310 315 320

Arg Asp Ile Ile Phe Glu Leu Arg Arg Ile Ala Phe Asp Ala Glu Ser  
325 330 335

Glu Pro Asn Asn Ser Ser Gly Ser Met Glu Lys Arg Lys Ser Met Tyr  
340 345 350

Thr Arg Asp Tyr Lys Lys Leu Gly Phe Ile Asn His Val Asn Pro Ala  
355 360 365

Met Asp Phe Thr Gln Thr Pro Pro Gly Met Leu Ala Leu Asp Asn Met  
370 375 380

Leu Tyr Phe Ala Lys His His Gln Asp Ala Tyr Ile Arg Ile Val Leu  
385 390 395 400

Glu Asn Ser Ser Arg Glu Asp Lys His Glu Cys Pro Phe Gly Arg Ser  
405 410 415

Ser Ile Glu Leu Thr Lys Met Leu Cys Glu Ile Leu Lys Val Gly Glu  
420 425 430

Leu Pro Ser Glu Thr Cys Asn Asp Phe His Pro Met Phe Phe Thr His  
435 440 445

Asp Arg Ser Phe Glu Glu Phe Phe Cys Ile Cys Ile Gln Leu Leu Asn  
450 455 460

Lys Thr Trp Lys Glu Met Arg Ala Thr Ser Glu Asp Phe Asn Lys Val  
465 470 475 480

Met Gln Val Val Lys Glu Gln Val Met Arg Ala Leu Thr Thr Lys Pro  
485 490 495

Ser Ser Leu Asp Gln Phe Lys Ser Lys Leu Gln Asn Leu Ser Tyr Thr  
500 505 510

Glu Ile Leu Lys Ile Arg Gln Ser Glu Arg Met Asn Gln Glu Asp Phe  
515 520 525

Gln Ser Arg Pro Ile Leu Glu Leu Lys Glu Lys Ile Gln Pro Glu Ile

530

535

540

Leu Glu Leu Ile Lys Gln Gln Arg Leu Asn Arg Leu Val Glu Gly Thr

545

550

555

560

Cys Phe Arg Lys Leu Asn Ala Arg Arg Arg Gln Asp Lys Phe Trp Tyr

565

570

575

Cys Arg Leu Ser Pro Asn His Lys Val Leu His Tyr Gly Asp Leu Glu

580

585

590

Glu Ser Pro Gln Gly Glu Val Pro His Asp Ser Leu Gln Asp Lys Leu

595

600

605

Pro Val Ala Asp Ile Lys Ala Val Val Thr Gly Lys Asp Cys Pro His

610

615

620

Met Lys Glu Lys Gly Ala Leu Lys Gln Asn Lys Glu Val Leu Glu Leu

625

630

635

640

Ala Phe Ser Ile Leu Tyr Asp Ser Asn Cys Gln Leu Asn Phe Ile Ala

645

650

655

Pro Asp Lys His Glu Tyr Cys Ile Trp Thr Asp Gly Leu Asn Ala Leu

660

665

670



Leu Gly Lys Asp Met Met Ser Asp Leu Thr Arg Asn Asp Leu Asp Thr

675

680

685

Leu Leu Ser Met Glu Ile Lys Leu Arg Leu Leu Asp Leu Glu Asn Ile

690

695

700

Gln Ile Pro Asp Ala Pro Pro Pro Ile Pro Lys Glu Pro Ser Asn Tyr

705

710

715

720

Asp Phe Val Tyr Asp Cys Asn

725

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1591

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 5

Met Gly Asn Ala Glu Ser Gln Asn Val Asp His Glu Phe Tyr Gly Glu

1

5

10

15

Lys His Ala Ser Leu Gly Arg Lys His Thr Ser Arg Ser Leu Arg Leu

20

25

30

Ser His Lys Thr Arg Arg Thr Arg His Ala Ser Ser Gly Lys Ala Ile

35 40 45

His Arg Asn Ser Glu Val Ser Thr Arg Ser Ser Ser Thr Pro Ser Ile  
50 55 60

Pro Gln Ser Leu Ala Glu Asn Gly Leu Glu Pro Phe Ser Gln Glu Gly  
65 70 75 80

Ala Leu Asp Asp Phe Gly Asp Pro Ile Trp Val Asp Arg Val Asp Met  
85 90 95

Gly Leu Arg Pro Val Ser Tyr Thr Asp Ser Ser Val Thr Pro Ser Val  
100 105 110

Asp Gly Ser Ile Val Leu Thr Ala Ala Ser Val Gln Ser Met Pro Asp  
115 120 125

Ser Glu Glu Ser Arg Leu Tyr Gly Asp Asp Ala Thr Tyr Leu Ala Glu  
130 135 140

Gly Gly Arg Arg Gln Cys Pro Tyr Thr Ser Asn Gly Pro Thr Phe Met  
145 150 155 160

Glu Thr Ala Ser Phe Lys Lys Lys Arg Ser Lys Ser Ala Asp Ile Trp  
165 170 175

Arg Glu Asp Ser Leu Glu Phe Ser Leu Ser Asp Leu Ser Gln Glu His

180 185 190  
Leu Thr Ser Asn Glu Glu Ile Leu Gly Ser Ala Glu Glu Lys Asp Cys  
195 200 205  
Glu Glu Ala Arg Gly Met Glu Thr Glu Ala Ser Pro Arg Gln Leu Ser  
210 215 220  
Thr Cys Gln Arg Ala Asn Ser Leu Gly Asp Leu Tyr Ala Gln Lys Asn  
225 230 235 240  
Ser Gly Val Lys Ala Asn Gly Gly Pro Arg Asn Arg Phe Ser Ser Tyr  
245 250 255  
Cys Arg Asn Leu Val Ser Asp Ile Pro Asp Leu Ala Lys His Lys Met  
260 265 270  
Pro Pro Ala Ala Ala Glu Glu Thr Pro Pro Tyr Ser Asn Tyr Asn Thr  
275 280 285  
Leu Pro Cys Arg Lys Ser His Cys Leu Ser Glu Gly Ala Thr Asn Pro  
290 295 300  
Gln Ile Ser Leu Ser Lys Ser Met Gln Gly Arg Arg Ala Lys Thr Thr  
305 310 315 320  
Gln Asp Val Asn Thr Gly Glu Gly Ser Glu Phe Ala Asp Ser Gly Ile

325 330 335

Glu Gly Ala Thr Thr Asp Thr Asp Leu Leu Ser Arg Arg Ser Asn Ala

340 345 350

Thr Asn Ser Ser Tyr Ser Pro Pro Thr Gly Arg Ala Phe Val Gly Ser

355 360 365

Asp Ser Gly Ser Ser Ser Thr Gly Asp Arg Ala Arg Gln Gly Val Tyr

370 375 380

Glu Asn Phe Arg Arg Glu Leu Glu Met Ser Thr Thr Asn Ser Glu Ser

385 390 395 400

Leu Glu Glu Ala Gly Ser Ala His Ser Asp Glu Gln Ser Ser Gly Thr

405 410 415

Leu Ser Ser Pro Gly Gln Ser Asp Ile Leu Leu Thr Ala Ala Gln Gly

420 425 430

Thr Val Arg Lys Ala Gly Ala Leu Ala Val Lys Asn Phe Leu Val His

435 440 445

Lys Lys Asn Lys Lys Val Glu Ser Ala Thr Arg Arg Lys Trp Lys His

450 455 460

Tyr Trp Val Ser Leu Lys Gly Cys Thr Leu Phe Phe Tyr Glu Thr Asp

465                      470                      475                      480  
Gly Arg Ser Gly Ile Asp His Asn Ser Val Pro Lys His Ala Val Trp  
                         485                      490                      495  
Val Glu Asn Ser Ile Val Gln Ala Val Pro Glu His Pro Lys Lys Asp  
                         500                      505                      510  
Phe Val Phe Cys Leu Ser Asn Ser Leu Gly Asp Ala Phe Leu Phe Gln  
                         515                      520                      525  
Thr Thr Ser Gln Thr Glu Leu Glu Asn Trp Ile Thr Ala Ile His Ser  
                         530                      535                      540  
Ala Cys Ala Ala Ala Val Ala Arg His His His Lys Glu Asp Thr Leu  
545                      550                      555                      560  
Arg Leu Leu Lys Ser Glu Ile Lys Lys Leu Glu Gln Lys Ile Asp Met  
                         565                      570                      575  
Asp Glu Lys Met Lys Lys Met Gly Glu Met Gln Leu Ser Ser Val Thr  
                         580                      585                      590  
Asp Ser Lys Lys Lys Lys Thr Ile Leu Asp Gln Ile Phe Val Trp Glu  
                         595                      600                      605  
Gln Asn Leu Glu Gln Phe Gln Met Asp Leu Phe Arg Phe Arg Cys Tyr

|   |     |         |
|---|-----|---------|
| 610   | 615 | 620     |
| Leu Ala Ser Leu Gln Gly Gly Glu Leu Pro Asn Pro Lys Arg Leu Leu |     |         |
| 625   | 630 | 635 640 |
| Ala Phe Ala Ser Arg Pro Thr Lys Val Ala Met Gly Arg Leu Gly Ile |     |         |
| 645   | 650 | 655     |
| Phe Ser Val Ser Ser Phe His Ala Leu Val Ala Ala Arg Thr Gly Glu |     |         |
| 660   | 665 | 670     |
| Ile Gly Val Arg Arg Arg Thr Gln Ala Met Ser Arg Ser Ala Ser Lys |     |         |
| 675   | 680 | 685     |
| Arg Arg Ser Arg Phe Ser Ser Leu Trp Gly Leu Asp Thr Thr Ser Lys |     |         |
| 690   | 695 | 700     |
| Lys Lys Gln Gly Arg Pro Thr Ile Asn Gln Val Phe Gly Glu Gly Thr |     |         |
| 705   | 710 | 715 720 |
| Asp Ala Val Lys Arg Ser Leu Glu Gly Ile Phe Asp Asp Thr Val Pro |     |         |
| 725   | 730 | 735     |
| Asp Gly Lys Arg Glu Lys Glu Val Val Leu Pro Ser Val His Gln His |     |         |
| 740   | 745 | 750     |
| Asn Pro Asp Cys Asp Ile Trp Val His Glu Tyr Phe Thr Pro Ser Trp |     |         |

755 760 765  
Phe Cys Leu Pro Asn Asn Gln Pro Ala Leu Thr Val Val Arg Pro Gly  
770 775 780  
Asp Thr Ala Arg Asp Thr Leu Glu Leu Ile Cys Lys Thr His Gln Leu  
785 790 795 800  
Asp His Ser Ala His Tyr Leu Arg Leu Lys Phe Leu Met Glu Asn Arg  
805 810 815  
Val Gln Phe Tyr Ile Pro Gln Pro Glu Glu Asp Ile Tyr Glu Leu Leu  
820 825 830  
Tyr Lys Glu Ile Glu Ile Cys Pro Lys Val Thr Gln Asn Ile His Ile  
835 840 845  
Glu Lys Ser Asp Ala Ala Ala Asp Asn Tyr Gly Phe Leu Leu Ser Ser  
850 855 860  
Val Asp Glu Asp Gly Ile Arg Arg Leu Tyr Val Asn Ser Val Lys Glu  
865 870 875 880  
Thr Gly Leu Ala Ser Lys Lys Gly Leu Lys Ala Gly Asp Glu Ile Leu  
885 890 895  
Glu Ile Asn Asn Arg Ala Ala Gly Thr Leu Asn Ser Ser Met Leu Lys

900 905 910

Asp Phe Leu Ser Gln Pro Ser Leu Gly Leu Leu Val Arg Thr Tyr Pro  
915 920 925

Glu Pro Glu Gly Gly Val Glu Leu Leu Glu Asn Pro Pro His Arg Val  
930 935 940

Asp Gly Pro Val Asp Leu Gly Glu Ser Pro Leu Ala Phe Leu Thr Ser  
945 950 955 960

Asn Pro Gly His Ser Leu Ser Ser Glu Gln Gly Ser Ser Ala Glu Thr  
965 970 975

Ala Pro Glu Glu Gly Glu Gly Pro Asp Leu Glu Ser Ser Asp Glu Thr  
980 985 990

Asp His Ser Ser Lys Ser Thr Glu Gln Val Ala Ala Phe Cys Arg Ser  
995 1000 1005

Leu His Glu Met Ser Pro Ser Asp Ser Ser Pro Ser Pro Gln Asp Ala  
1010 1015 1020

Thr Ser Pro Gln Leu Ala Thr Thr Arg Gln Leu Ser Asp Ala Asp Lys  
1025 1030 1035 1040

Leu Arg Lys Val Ile Cys Glu Leu Leu Glu Thr Glu Arg Thr Tyr Val



|   |      |      |      |
|---|------|------|------|
| 1045  | 1050 | 1055 |      |
| Lys Asp Leu Asn Cys Leu Met Glu Arg Tyr Leu Lys Pro Leu Gln Lys |      |      |      |
| 1060  | 1065 | 1070 |      |
| Glu Thr Phe Leu Thr Gln Asp Glu Leu Asp Val Leu Phe Gly Asn Leu |      |      |      |
| 1075  | 1080 | 1085 |      |
| Thr Glu Met Val Glu Phe Gln Val Glu Phe Leu Lys Thr Leu Glu Asp |      |      |      |
| 1090  | 1095 | 1100 |      |
| Gly Val Arg Leu Val Pro Asp Leu Glu Lys Leu Glu Lys Val Asp Gln |      |      |      |
| 1105  | 1110 | 1115 | 1120 |
| Phe Lys Lys Val Leu Phe Ser Leu Gly Gly Ser Phe Leu Tyr Tyr Ala |      |      |      |
| 1125  | 1130 | 1135 |      |
| Asp Arg Phe Lys Leu Tyr Ser Ala Phe Cys Ala Ser His Thr Lys Val |      |      |      |
| 1140  | 1145 | 1150 |      |
| Pro Lys Val Leu Val Lys Ala Lys Thr Asp Thr Ala Phe Lys Ala Phe |      |      |      |
| 1155  | 1160 | 1165 |      |
| Leu Asp Ala Gln Asn Pro Arg Gln Gln His Ser Ser Thr Leu Glu Ser |      |      |      |
| 1170  | 1175 | 1180 |      |
| Tyr Leu Ile Lys Pro Ile Gln Arg Val Leu Lys Tyr Pro Leu Leu Leu |      |      |      |

1185                      1190                      1195                      1200

Arg Glu Leu Phe Ala Leu Thr Asp Ala Glu Ser Glu Glu His Tyr His

1205                      1210                      1215

Leu Asp Val Ala Ile Lys Thr Met Asn Lys Val Ala Ser His Ile Asn

1220                      1225                      1230

Glu Met Gln Lys Ile His Glu Glu Phe Gly Ala Val Phe Asp Gln Leu

1235                      1240                      1245

Ile Ala Glu Gln Thr Gly Glu Lys Lys Glu Val Ala Asp Leu Ser Met

1250                      1255                      1260

Gly Asp Leu Leu Leu His Thr Ser Val Ile Trp Leu Asn Pro Pro Ala

1265                      1270                      1275                      1280

Ser Leu Gly Lys Trp Lys Lys Glu Pro Glu Leu Ala Ala Phe Val Phe

1285                      1290                      1295

Lys Thr Ala Val Val Leu Val Tyr Lys Asp Gly Ser Lys Gln Lys Lys

1300                      1305                      1310

Lys Leu Val Gly Ser His Arg Leu Ser Ile Tyr Glu Glu Trp Asp Pro

1315                      1320                      1325

Phe Arg Phe Arg His Met Ile Pro Thr Glu Ala Leu Gln Val Arg Ala

1330                      1335                      1340

Leu Pro Ser Ala Asp Ala Glu Ala Asn Ala Val Cys Glu Ile Val His

1345                      1350                      1355                      1360

Val Lys Ser Glu Ser Glu Gly Arg Pro Glu Arg Val Phe His Leu Cys

                    1365                      1370                      1375

Cys Ser Ser Pro Glu Ser Arg Lys Asp Phe Leu Lys Ser Val His Ser

                    1380                      1385                      1390

Ile Leu Arg Asp Lys His Arg Arg Gln Leu Leu Lys Thr Glu Ser Leu

                    1395                      1400                      1405

Pro Ser Ala Gln Gln Tyr Val Pro Phe Gly Gly Lys Arg Leu Cys Ala

                    1410                      1415                      1420

Leu Lys Gly Ala Arg Pro Ala Met Ser Arg Ala Val Ser Ala Pro Ser

1425                      1430                      1435                      1440

Lys Ser Leu Gly Arg Arg Arg Arg Arg Leu Ala Arg Asn Arg Phe Thr

                    1445                      1450                      1455

Ile Asp Ser Asp Ala Ile Ser Ala Ser Ser Pro Glu Lys Glu Pro Gln

                    1460                      1465                      1470

Gln Pro Ala Gly Gly Gly Asp Thr Asp Arg Trp Val Glu Glu Gln Phe

|   |      |      |
|---|------|------|
| 1475  | 1480 | 1485 |
| Asp Leu Ala Gln Tyr Glu Glu Gln Asp Asp Ile Lys Glu Thr Asp Ile |      |      |
| 1490  | 1495 | 1500 |
| Leu Ser Asp Asp Asp Glu Phe Cys Glu Ser Leu Lys Gly Ala Ser Val |      |      |
| 1505  | 1510 | 1515 |
| 1520  |      |      |
| Asp Arg Asp Leu Gln Glu Gln Leu Gln Ala Ala Ser Ile Ser Gln Arg |      |      |
| 1525  | 1530 | 1535 |
| Ala Arg Gly Arg Arg Thr Leu Asp Ser His Ala Ser Arg Met Thr Gln |      |      |
| 1540  | 1545 | 1550 |
| Leu Lys Lys Gln Ala Ala Leu Ser Gly Ile Asn Gly Gly Leu Glu Ser |      |      |
| 1555  | 1560 | 1565 |
| Ala Ser Glu Glu Val Ile Trp Val Arg Arg Glu Asp Phe Ala Pro Ser |      |      |
| 1570  | 1575 | 1580 |
| Arg Lys Leu Asn Thr Glu Ile                                     |      |      |
| 1585  | 1590 |      |

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1591

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Met Gly Asn Ala Glu Ser Gln His Val Glu His Glu Phe Tyr Gly Glu

1 5 10 15

Lys His Ala Ser Leu Gly Arg Asn Asp Thr Ser Arg Ser Leu Arg Leu

20 25 30

Ser His Lys Thr Arg Arg Thr Arg His Ala Ser Ser Gly Lys Val Ile

35 40 45

His Arg Asn Ser Glu Val Ser Thr Arg Ser Ser Ser Thr Pro Ser Ile

50 55 60

Pro Gln Ser Leu Ala Glu Asn Gly Leu Glu Pro Phe Ser Gln Asp Gly

65 70 75 80

Thr Leu Glu Asp Phe Gly Ser Pro Ile Trp Val Asp Arg Val Asp Met

85 90 95

Gly Leu Arg Pro Val Ser Tyr Thr Asp Ser Ser Val Thr Pro Ser Val

100 105 110

Asp Ser Ser Ile Val Leu Thr Ala Ala Ser Val Gln Ser Met Pro Asp

115 120 125

Thr Glu Glu Ser Arg Leu Tyr Gly Asp Asp Ala Thr Tyr Leu Ala Glu  
130 135 140

Gly Gly Arg Arg Gln His Ser Tyr Thr Ser Asn Gly Pro Thr Phe Met  
145 150 155 160

Glu Thr Ala Ser Phe Lys Lys Lys Arg Ser Lys Ser Ala Asp Ile Trp  
165 170 175

Arg Glu Asp Ser Leu Glu Phe Ser Leu Ser Asp Leu Ser Gln Glu His  
180 185 190

Leu Thr Ser Asn Glu Glu Ile Leu Gly Ser Ala Glu Glu Lys Asp Cys  
195 200 205

Glu Glu Ala Arg Gly Met Glu Thr Arg Ala Ser Pro Arg Gln Leu Ser  
210 215 220

Thr Cys Gln Arg Ala Asn Ser Leu Gly Asp Leu Tyr Ala Gln Lys Asn  
225 230 235 240

Ser Gly Val Thr Ala Asn Met Gly Pro Gly Ser Lys Phe Ala Gly Tyr  
245 250 255

Cys Arg Asn Leu Val Ser Asp Ile Pro Asn Leu Ala Asn His Lys Met  
260 265 270

Pro Pro Ala Ala Ala Glu Glu Thr Pro Pro Tyr Ser Asn Tyr Asn Thr  
275 280 285

Leu Pro Cys Arg Lys Ser His Cys Leu Ser Glu Gly Ala Thr Asn Pro  
290 295 300

Gln Ile Ser His Ser Asn Ser Met Gln Gly Arg Arg Ala Lys Thr Thr  
305 310 315 320

Gln Asp Val Asn Ala Gly Glu Gly Ser Glu Phe Ala Asp Ser Gly Ile  
325 330 335

Glu Gly Ala Thr Thr Asp Thr Asp Leu Leu Ser Arg Arg Ser Asn Ala  
340 345 350

Thr Asn Ser Ser Tyr Ser Pro Thr Thr Gly Arg Ala Phe Val Gly Ser  
355 360 365

Asp Ser Gly Ser Ser Ser Thr Gly Asp Ala Ala Arg Gln Gly Val Tyr  
370 375 380

Glu Asn Phe Arg Arg Glu Leu Glu Met Ser Thr Thr Asn Ser Glu Ser  
385 390 395 400

Leu Glu Glu Ala Gly Ser Ala His Ser Asp Glu Gln Ser Ser Gly Thr  
405 410 415

Leu Ser Ser Pro Gly Gln Ser Asp Ile Leu Leu Thr Ala Ala Gln Gly  
420 425 430

Thr Val Arg Lys Ala Gly Ala Leu Ala Val Lys Asn Phe Leu Val His  
435 440 445

Lys Lys Asn Lys Lys Val Glu Ser Ala Thr Arg Arg Lys Trp Lys His  
450 455 460

Tyr Trp Val Ser Leu Lys Gly Cys Thr Leu Phe Phe Tyr Glu Ser Asp  
465 470 475 480

Gly Arg Ser Gly Ile Asp His Asn Ser Ile Pro Lys His Ala Val Trp  
485 490 495

Val Glu Asn Ser Ile Val Gln Ala Val Pro Glu His Pro Lys Lys Asp  
500 505 510

Phe Val Phe Cys Leu Ser Asn Ser Leu Gly Asp Ala Phe Leu Phe Gln  
515 520 525

Thr Thr Ser Gln Thr Glu Leu Glu Asn Trp Ile Thr Ala Ile His Ser  
530 535 540

Ala Cys Ala Thr Ala Val Ala Arg His His His Lys Glu Asp Thr Leu  
545 550 555 560



Arg Leu Leu Lys Ser Glu Ile Lys Lys Leu Glu Gln Lys Ile Asp Met  
565 570 575

Asp Glu Lys Met Lys Lys Met Gly Glu Met Gln Leu Ser Ser Val Thr  
580 585 590

Asp Ser Lys Lys Lys Lys Thr Ile Leu Asp Gln Ile Phe Val Trp Glu  
595 600 605

Gln Asn Leu Glu Gln Phe Gln Met Asp Leu Phe Arg Phe Arg Cys Tyr  
610 615 620

Leu Ala Ser Leu Gln Gly Gly Glu Leu Pro Asn Pro Lys Arg Leu Leu  
625 630 635 640

Ala Phe Ala Ser Arg Pro Thr Lys Val Ala Met Gly Arg Leu Gly Ile  
645 650 655

Phe Ser Val Ser Ser Phe His Ala Leu Val Ala Ala Arg Thr Gly Glu  
660 665 670

Thr Gly Val Arg Arg Arg Thr Gln Ala Met Ser Arg Ser Ala Ser Lys  
675 680 685

Arg Arg Ser Arg Phe Ser Ser Leu Trp Gly Leu Asp Thr Thr Ser Lys  
690 695 700

Lys Lys Gln Gly Arg Pro Ser Ile Asn Gln Val Phe Gly Glu Gly Thr  
705 710 715 720

Glu Ala Val Lys Lys Ser Leu Glu Gly Ile Phe Asp Asp Ile Val Pro  
725 730 735

Asp Gly Lys Arg Glu Lys Glu Val Val Leu Pro Asn Val His Gln His  
740 745 750

Asn Pro Asp Cys Asp Ile Trp Val His Glu Tyr Phe Thr Pro Ser Trp  
755 760 765

Phe Cys Leu Pro Asn Asn Gln Pro Ala Leu Thr Val Val Arg Pro Gly  
770 775 780

Asp Thr Ala Arg Asp Thr Leu Glu Leu Ile Cys Lys Thr His Gln Leu  
785 790 795 800

Asp His Ser Ala His Tyr Leu Arg Leu Lys Phe Leu Ile Glu Asn Lys  
805 810 815

Met Gln Leu Tyr Val Pro Gln Pro Glu Glu Asp Ile Tyr Glu Leu Leu  
820 825 830

Tyr Lys Glu Ile Glu Ile Cys Pro Lys Val Thr His Ser Ile His Ile  
835 840 845

Glu Lys Ser Asp Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Ser  
850 855 860

Val Glu Glu Asp Gly Ile Arg Arg Leu Tyr Val Asn Ser Val Lys Glu  
865 870 875 880

Thr Gly Leu Ala Ser Lys Lys Gly Leu Lys Ala Gly Asp Glu Ile Leu  
885 890 895

Glu Ile Asn Asn Arg Ala Ala Asp Ala Leu Asn Ser Ser Met Leu Lys  
900 905 910

Asp Phe Leu Ser Gln Pro Ser Leu Gly Leu Leu Val Arg Thr Tyr Pro  
915 920 925

Glu Leu Glu Glu Gly Val Glu Leu Leu Glu Ser Pro Pro His Arg Val  
930 935 940

Asp Gly Pro Ala Asp Leu Asp Glu Ser Pro Leu Ala Phe Leu Thr Ser  
945 950 955 960

Asn Pro Gly His Ser Leu Cys Ser Glu Gln Gly Ser Ser Ala Glu Thr  
965 970 975

Ala Pro Glu Glu Thr Glu Gly Pro Asp Leu Glu Ser Ser Asp Glu Thr  
980 985 990

Asp His Ser Ser Lys Ser Thr Glu Gln Val Ala Ala Phe Cys Arg Ser  
995 1000 1005

Leu His Glu Met Asn Pro Ser Asp Gln Asn Pro Ser Pro Gln Asp Ser  
1010 1015 1020

Thr Gly Pro Gln Leu Ala Thr Met Arg Gln Leu Ser Asp Ala Asp Asn  
1025 1030 1035 1040

Val Arg Lys Val Ile Cys Glu Leu Leu Glu Thr Glu Arg Thr Tyr Val  
1045 1050 1055

Lys Asp Leu Asn Cys Leu Met Glu Arg Tyr Leu Lys Pro Leu Gln Lys  
1060 1065 1070

Glu Thr Phe Leu Thr Gln Asp Glu Leu Asp Val Leu Phe Gly Asn Leu  
1075 1080 1085

Thr Glu Met Val Glu Phe Gln Val Glu Phe Leu Lys Thr Leu Glu Asp  
1090 1095 1100

Gly Val Arg Leu Val Pro Asp Leu Glu Lys Leu Glu Lys Val Asp Gln  
1105 1110 1115 1120

Phe Lys Lys Val Leu Phe Ser Leu Gly Gly Ser Phe Leu Tyr Tyr Ala  
1125 1130 1135

Asp Arg Phe Lys Leu Tyr Ser Ala Phe Cys Ala Ile His Thr Lys Val  
1140 1145 1150

Pro Lys Val Leu Val Lys Ala Lys Thr Asp Thr Ala Phe Lys Ala Phe  
1155 1160 1165

Leu Asp Ala Gln Asn Pro Lys Gln Gln His Ser Ser Thr Leu Glu Ser  
1170 1175 1180

Tyr Leu Ile Lys Pro Ile Gln Arg Ile Leu Lys Tyr Pro Leu Leu Leu  
1185 1190 1195 1200

Arg Glu Leu Phe Ala Leu Thr Asp Ala Glu Ser Glu Glu His Tyr His  
1205 1210 1215

Leu Asp Val Ala Ile Lys Thr Met Asn Lys Val Ala Ser His Ile Asn  
1220 1225 1230

Glu Met Gln Lys Ile His Glu Glu Phe Gly Ala Val Phe Asp Gln Leu  
1235 1240 1245

Ile Ala Glu Gln Thr Gly Glu Lys Lys Glu Val Ala Asp Leu Ser Met  
1250 1255 1260

Gly Asp Leu Leu Leu His Thr Thr Val Ile Trp Leu Asn Pro Pro Ala  
1265 1270 1275 1280

Ser Leu Gly Lys Trp Lys Lys Glu Pro Glu Leu Ala Ala Phe Val Phe  
1285 1290 1295

Lys Thr Ala Val Val Leu Val Tyr Lys Asp Gly Ser Lys Gln Lys Lys  
1300 1305 1310

Lys Leu Val Gly Ser His Arg Leu Ser Ile Tyr Glu Asp Trp Asp Pro  
1315 1320 1325

Phe Arg Phe Arg His Met Ile Pro Thr Glu Ala Leu Gln Val Arg Ala  
1330 1335 1340

Leu Ala Ser Ala Asp Ala Glu Ala Asn Ala Val Cys Glu Ile Val His  
1345 1350 1355 1360

Val Lys Ser Glu Ser Glu Gly Arg Pro Glu Arg Val Phe His Leu Cys  
1365 1370 1375

Cys Ser Ser Pro Glu Ser Arg Lys Asp Phe Leu Lys Ala Val His Ser  
1380 1385 1390

Ile Leu Arg Asp Lys His Arg Arg Gln Leu Leu Lys Thr Glu Ser Leu  
1395 1400 1405

Pro Ser Ser Gln Gln Tyr Val Pro Phe Gly Gly Lys Arg Leu Cys Ala  
1410 1415 1420

Leu Lys Gly Ala Arg Pro Ala Met Ser Arg Ala Val Ser Ala Pro Ser  
1425 1430 1435 1440

Lys Ser Leu Gly Arg Arg Arg Arg Arg Leu Ala Arg Asn Arg Phe Thr  
1445 1450 1455

Ile Asp Ser Asp Ala Val Ser Ala Ser Ser Pro Glu Lys Glu Ser Gln  
1460 1465 1470

Gln Pro Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asp Arg Trp Val Glu Glu Gln Phe  
1475 1480 1485

Asp Leu Ala Gln Tyr Glu Glu Gln Asp Asp Ile Lys Glu Thr Asp Ile  
1490 1495 1500

Leu Ser Asp Asp Asp Glu Phe Cys Glu Ser Val Lys Gly Ala Ser Val  
1505 1510 1515 1520

Asp Arg Asp Leu Gln Glu Arg Leu Gln Ala Thr Ser Ile Ser Gln Arg  
1525 1530 1535

Glu Arg Gly Arg Lys Thr Leu Asp Ser His Ala Ser Arg Met Ala Gln  
1540 1545 1550

Leu Lys Lys Gln Ala Ala Leu Ser Gly Ile Asn Gly Gly Leu Glu Ser  
1555 1560 1565

Ala Ser Glu Glu Val Ile Trp Val Arg Arg Glu Asp Phe Ala Pro Ser

1570

1575

1580

Arg Lys Leu Asn Thr Glu Ile

1585

1590

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HA-tag

<400> 7

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1

5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14538

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/566, 33/50, 33/15, C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/566, 33/50, 33/15, C12N15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2004 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2004 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2004 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS, JOIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages             | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | NATURE, Vol.412, (2001), pages 826 to 831  | 1-35,38,39            |
| A         | NATURE, Vol.375, (1995), pages 338 to 340  | 1-35,38,39            |
| A         | CELL, Vol.107, (2001), pages 27 to 41  | 1-35,38,39            |
| A         | BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Vol.1452, (1999), pages 179 to 187                              | 1-35,38,39            |
| A         | BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol.296, (August, 2002), pages 716 to 720 | 1-35,38,39            |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 February, 2004 (16.02.04)

Date of mailing of the international search report  
02 March, 2004 (02.03.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14538

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 36, 37

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

It is unclear what specific substances are included in the scope of a remedy obtained by a specific searching method.

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(1) Claims 1 to 12, 36 and 37 relate to screening of a substance interfering the association of DOCK2 with ELMO and a remedy obtained by the screening.

(2) Claims 13 to 25 relate to screening of a substance interfering the association of ELMO with a GDP/GTP exchange factor.

(3) Claims 26 to 35 relate to screening of a Rac activation promoter or inhibitor by evaluating the degree of association with the use of DOCK2, ELMO and a GDP/GTP exchange factor.

(4) Claim 38 relates to screening of a DOCK2 function inhibitor by evaluating the degree of the formation of the association of DOCK2 with an SH3 domain-binding protein. (Continued to extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14538

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

(5) Claim 39 relates to screening of DOCK2 function inhibitor by evaluating the degree of the formation of the association of a DOCK2 functional domain with a functional domain-associated molecule.

The above groups (1) to (5) of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/566, 33/50, 33/15, C12N15/12

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/566, 33/50, 33/15, C12N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2004年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2004年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, JOIS

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A               | NATURE, VOL. 412, (2001), p. 826-831   | 1-35, 38, 39     |
| A               | NATURE, VOL. 375, (1995), p. 338-340   | 1-35, 38, 39     |
| A               | CELL, VOL. 107, (2001), p. 27-41   | 1-35, 38, 39     |
| A               | BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, VOL. 1452, (1999), p. 179-187                               | 1-35, 38, 39     |
| A               | BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, VOL. 296<br>(AUGUST 2002), p. 716-720 | 1-35, 38, 39     |

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.02.04

国際調査報告の発送日

02.3.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之

2 J

9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 36, 37 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
特定の探索方法により得られる治療薬、には具体的に如何なる物質が含まれるのか不明確である。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

- (1) 請求の範囲1-12, 35, 37は、DOCK2とELMOの会合に干渉する物質スクリーニングすること及び、スクリーニングにより得られる治療薬に関するものである。
- (2) 請求の範囲13-25は、ELMOとGDP/GTP変換因子の会合に干渉する物質スクリーニングすることに関するものである。
- (3) 請求の範囲26-35は、DOCK2とELMOとGDP/GTP変換因子を用いて会合の程度を評価することによりRac活性化促進物質又は抑制物質をスクリーニングすることに関するものである。
- (4) 請求の範囲38はDOCK2とSH3ドメイン結合タンパク質との会合形成の程度を評価することによりDOCK2機能阻害物質をスクリーニングすることに関するものである。
- (5) 請求の範囲39はDOCK2の機能ドメインと標的ドメイン会合分子との会合形成の程度を評価することによりDOCK2機能阻害物質をスクリーニングすることに関するものである。

そして、上記(1)-(5)の発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。